

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А.В. Караулов, академик РАН, д-р мед. наук, проф.;
М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

И.А. Балдуева, д-р мед. наук (Санкт-Петербург, Россия); О.А. Бочарова, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия); А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); М.И. Давыдов, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия); Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); М.В. Дмитриева, канд. фарм. наук, ответственный секретарь (Москва, Россия); И.В. Евсегнеева, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва, Россия); З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); В.П. Краснов, д-р хим. наук, проф. (Екатеринбург, Россия); И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва, Россия); И.Г. Меерович, канд. биол. наук (Омаха, Небраска, США); А.В. Мисюрин, канд. биол. наук (Москва, Россия); И.Р. Набиев, д-р хим. наук, проф. (Реймс, Франция); В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород, Россия); Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф. (Москва, Россия); Н.Я. Рапопорт, д-р хим. наук, проф. (Солт-Лейк-Сити, Юта, США); В.В. Решетникова, канд. техн. наук (Москва, Россия); Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва, Россия); Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва, Россия); Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); И.Ж. Шубина, д-р биол. наук (Москва, Россия); Р.И. Якубовская, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 Г.

4^{ТОМ 15}
'16

Издательская группа РОНЦ:
115478 Москва, Каширское ш., 24
Турнянская Е.Г., Крюков Б.Б.

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7(499) 324-10-65;
факс +7(499) 324-22-74
E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru

Адрес редакции:
115478, Москва,
Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор Т.Л. Кузьмичева
Корректор Т.А. Афанасьева
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор). Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.
При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784
Российский биотерапевтический
журнал. 2016. Том 15. № 4. 1–122
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» – 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.
www.ronc.ru/node/795

Мероприятия в 2017 г.



Глубокоуважаемые коллеги!

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей,

Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения РАН

16–17 марта 2017 г. проводят XIV Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова.

Тезисы и тексты докладов конференции будут опубликованы в «Российском биотерапевтическом журнале».

Оргкомитет оставляет за собой право отбора докладов.

Принять участие в конференции можно, выслав регистрационную форму и тезисы доклада на электронную почту: conference-edito@mail.ru

Срок подачи заявки для участия с докладом – **25 января 2017 г.**

Срок подачи тезисов (для публикации) – **25 января 2017 г.**

Регистрация участников – **до 1 марта 2017 г.**

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться к секретарю Оргкомитета Решетниковой Вере Владимировне: тел. +7 (499) 324-55-85, +7 (926) 505-72-55; e-mail: conference-edito@mail.ru

**16–17
марта
2017 г.
Москва**

XIV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ» ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА

Место проведения: г. Москва, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское шоссе, 24 (Большой актовый зал).

Основные научные направления:

- доклинические и клинические исследования лекарственных средств;
- разработка лекарственных препаратов;
- отечественные противоопухолевые препараты;
- направленная доставка лекарственных препаратов;
- диагностика и лечение онкологических заболеваний;
- фотодинамическая терапия;
- клеточные технологии;
- иммунотерапия и биотерапия опухолей.

Планируемые мероприятия конференции:

секции: пленарная, экспериментальная онкология, клиническая онкология, фотодинамическая терапия, стендовая секция, секция молодых ученых;

выставка «Противоопухолевые и диагностические препараты».

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses)

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

Federal State Budgetary Scientific Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"
of the Ministry of Health of Russia

Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

EDITOR-IN-CHIEF

Z.S. Shprakh, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

A.V. Karaulov, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia);

M.A. Baryshnikova, PhD (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

I.A. Baldueva, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); **O.A. Bocharova**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **A.K. Golenkov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.I. Davydov**, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia); **L.V. Demidov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.V. Dmitrieva**, PhD, Executive Editor (Moscow, Russia); **I.V. Evsegneeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **P.K. Ivanov**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **Z.G. Kadagidze**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **V.P. Krasnov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **I.Y. Kubasova**, PhD (Moscow, Russia); **I.G. Meerovich**, PhD (Omaha, Nebraska, USA); **A.V. Misyurin**, PhD (Moscow, Russia); **I.R. Nabiev**, PhD, Professor (Reims, France); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhniy Novgorod, Russia); **N.A. Oborotova**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **N.Ya. Rapoport** (Salt Lake City, Utah, USA); **V.V. Reshetnikova**, PhD (Moscow, Russia); **N.S. Sergeeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.V. Stepanova**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **N.N. Tupitsin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.G. Turnyanskaya**, PhD (Moscow, Russia); **Yu.V. Shishkin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002

4 VOL. 15
'16

Publishing group of "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478
Turnyanskaya E.G., Kryukov B.B.

FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" of the Ministry of Health of Russia, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors. Tel.: +7(499) 324-10-65
Fax: +7(499) 324-22-74
e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor T.L. Kuz'micheva
Proofreader T.A. Afanaseva
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002; ПИ № ФС77-53039
dated 04.03.2013

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal".

ISSN 1726-9784

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2016. Volume 15. No 4. 1–122

© PH "ABV-Press", 2016

Rospechat' catalogue index: 81679

Printed at the Mediacolor LLC
1,000 copies

www.ronc.ru/node/795

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>А.А. Вартамян, К.А. Барышников</i> Терапия, направленная на стволовую клетку опухоли: надежды и возможности.	8
<i>А.В. Мисюрин</i> Основы молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний	18
<i>А.А. Кескинов, М.Р. Щурин, В.М. Бухман, З.С. Шпрах</i> Патологические изменения дендритных клеток при раке	25

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Б.Е. Полоцкий, Б.Б. Ахмедов, Е.А. Бозуш, Е.А. Дудко, Т.А. Бозуш, М.М. Давыдов</i> Уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов β в ткани немелкоклеточного рака и метастазов в легком	34
<i>Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Ш.Г. Хакимова, А.А. Борунова, Д.В. Табаков, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе</i> Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови больных первично-операбельным раком молочной железы	37
<i>Ю.В. Стукалов, Е.Ю. Григорьева, Н.С. Калыгина, Е.Ю. Колдаева, А.С. Масько</i> Окислительно-восстановительные дендримеры	40
<i>А.С. Гриневич, М.Н. Краева, О.С. Бурова, П.К. Иванов</i> Использование олигосахаридов иммуноглобулинов для модификации моноклональных антител	44

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Т.А. Бозуш, Е.А. Дудко, Е.А. Шестакова, А.Н. Гришанина, Е.А. Бозуш, В.Ю. Курсанов, О.М. Рябина, Н.О. Вихлянцева</i> Количественная оценка уровня экспрессии белка BRCA1 в ткани рака молочной железы с использованием метода проточной цитофлуориметрии	49
<i>Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин, Ю.П. Финашутина, Т.В. Ахлынина, Л.А. Кесаева, В.В. Тихонова, Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин</i> Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку pRame.	53
<i>В.И. Карасева, Т.В. Осипова, Ю.М. Букреев</i> Перспективные способы экспериментальной противоопухолевой иммунотерапии на основе реакции гиперчувствительности замедленного типа	59
<i>Н.В. Андропова, Л.Ф. Морозова, И.Н. Михайлова, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова, Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Ю.А. Борисова, С.М. Ситдикова, Е.М. Трещалина</i> Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF на иммунодефицитных мышках для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств.	65
<i>О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, З.С. Шпрах, М.П. Киселева, Л.М. Борисова, М.В. Дмитриева, Ю.В. Родионова, С.В. Копачевская, Т.Ю. Еськина, З.С. Смирнова</i> Создание лабораторной технологии воспроизведенной лекарственной формы эпирубицина	72
<i>Е.В. Санарова, Си Чжан, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, И.И. Краснюк</i> Особенности технологии получения липосомальной лекарственной формы аналога гипоталамического гормона соматостатина	78
<i>В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах</i> Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение I).	85

*И.С. Голубева, Н.П. Яворская, М.А. Барышникова, Д.А. Афанасьева, А.А. Рудакова,
Г.Н. Апрышко, Н.С. Рукк, А.Ю. Скрыбина*

**Исследование потенциальной противоопухолевой активности некоторых
координационных соединений редкоземельных элементов с антипирином 89**

*М.Ю. Ревтович, Ю.П. Истомин, О.В. Красько, Е.М. Трещалина, П.М. Бычковский,
Т.Л. Юркитович, А.И. Шмак, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская, Р.И. Костерова,
С.О. Соломевич, Ю.И. Rogov*

**Противоопухолевая активность гидрогелевой формы цисплатина
на асцитной гепатоме Зайделя 96**

*А.В. Мисюрин, Е.Н. Мисюрина, В.В. Тихонова, А.А. Крутов, Л.А. Кесаева,
Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, Н.Н. Касаткина, Е.А. Османов,
А.Г. Туркина, Е.Ю. Чельшева, А.Ю. Барышников*

**Частота встречаемости мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*
у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к терапии иматинибом. 102**

О.П. Колбацкая, Н.А. Фалалеева, А.М. Моженкова, Н.А. Купрышина, А.И. Павловская

Иммунологические аспекты поражения костного мозга при фолликулярной лимфоме. 110

Н.А. Фалалеева

**Симптомы интоксикации при фолликулярной лимфоме:
вероятный патогенез и клиническое значение 117**

REVIEWS

<i>A.A. Vartanian, K.A. Baryshnikov</i> Therapies targeting cancer stem cells of the tumor: the one and only hope	8
<i>A.V. Misyurin</i> Essentials of the molecular diagnosis of oncohematological diseases	18
<i>A.A. Keskinov, M.R. Shurin, V.M. Bukhman, Z.S. Shprakh</i> Pathophysiology of dendritic cells in cancer	25

BRIEF REPORT

<i>B.E. Polotsky, B.B. Akhmedov, E.A. Bogush, E.A. Dudko, T.A. Bogush, M.M. Davydov</i> Expression level of estrogen receptor β in non-small cell lung cancer and lung metastasis	34
<i>T.N. Zabolina, O.V. Korotkova, Sh.G. Hakimova, A.A. Borunova, D.V. Tabakov, I.K. Vorotnikov, Z.G. Kadagidze</i> Immunological phenotype of peripheral blood lymphocytes of patients with primary operable breast cancer	37
<i>Yu.V. Stukalov, E. Yu. Grigorieva, N.S. Kalygina, E. Yu. Koldaeva, A.S. Masko</i> Redox dendrimers	40
<i>A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, O.S. Burova, P.K. Ivanov</i> The use of oligosaccharides of immunoglobulin for modification of monoclonal antibodies	44

ORIGINAL REPORTS

<i>T.A. Bogush, E.A. Dudko, E.A. Shestakova, A.N. Grishanina, E.A. Bogush, V.Ju. Kirsanov, O.M. Ryabinina, N.O. Vichljantzeva</i> Quantitative estimation of BRCA1 protein expression in breast cancer tissue using the method of flow cytometry	49
<i>N.A. Lyzhko, V.A. Misyurin, Y.P. Finashutina, T.V. Akhlynina, L.A. Kesaeva, V.V. Tikhonova, N.N. Kasatkina, O.N. Solopova, M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin</i> Development of cytostatic effect of monoclonal antibodies to the proteins PRAME	53
<i>V.I. Karaseva, T.V. Osipova, Yu.M. Bukreev</i> Advanced methods of experimental cancer immunotherapy based on the delayed-type hypersensitivity	59
<i>N.V. Andronova, L.F. Morozova, I.N. Mikhailova, A.A. Lushnikova, D.A. Ponkratova, N.T. Raychlin, I.A. Bukaeva, U.A. Borisova, S.M. Sitdikova, H.M. Treshalina</i> Modeling of a subcutaneous xenograft of human skin melanoma mel Cher with V600E BRAF mutation in immunodeficient mice for preclinical study the targeting anticancer drugs	65
<i>O.L. Orlova, A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, Z.S. Shprakh, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova, M.V. Dmitrieva, Y.V. Rodionova, S.V. Kopachevskaya, T.Y. Eskina, [Z.S. Smirnova]</i> Creating laboratory technology of generic epirubicin pharmaceutical dosage form	72
<i>E.V. Sanarova, Xi Zhang, M.V. Dmitrieva, A.V. Lantsova, O.L. Orlova, A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, I.I. Krasnyuk</i> Features of the technology of liposomal formulation of a analogue hypothalamic hormone somatostatin	78
<i>V.N. Osipov, L.P. Sushinina, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, Z.S. Shprakh</i> Cyphetrylin cytotoxic analogues (report I)	85

<i>I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, M.A. Baryshnikova, D.A. Afanasieva, A.A. Rudakova, G.N. Apryshko, N.S. Rukk, A.Yu. Skraybina</i> Potential antitumor activity studies on some coordination compounds of rare earth elements with antipyrine	89
<i>M.Yu. Reutovich, Yu.P. Istomin, O.V. Krasko, H.M. Treshalina, P.M. Bychkovsky, T.L. Yurkshtovich, A.I. Shmak, N.V. Golub, V.A. Alinovskaya, R.I. Kosterova, S.O. Solomevich, Y.I. Rogov</i> Antitumor effect of hydrogel cisplatin on Zejdel ascites hepatoma	96
<i>A.V. Misyurin, E.N. Misyurina, V.V. Tichonova, A.A. Krutov, L.A. Kesaeva, Yu.P. Finashutina, V.A. Misyurin, N.N. Kasatkina, E.A. Osmanov, A.G. Turkina, E.Yu. Chelysheva, A.Yu. Baryshnikov</i> BCR-ABL gene kinase domain mutation frequency in imatinib resistant chronic myeloid leukemia patients	102
<i>O.P. Kolbatskaya, N.A. Falaleeva, A.M. Mozhenkova, N.A. Kupryshina, A.I. Pavlovskaya</i> Immunological aspects of bone marrow involvement in follicular lymphoma	110
<i>N.A. Falaleeva</i> Intoxication symptoms in follicular lymphoma: probable pathogenesis and clinical significance	117

ТЕРАПИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА СТВОЛОВУЮ КЛЕТКУ ОПУХОЛИ: НАДЕЖДЫ И ВОЗМОЖНОСТИ

А.А. Вартамян, К.А. Барышников

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

Фундаментальной проблемой в лечении рака остается идентификация клеток, способных инициировать и поддерживать рост опухоли. До недавнего времени предполагалось, что все клетки опухоли обладают одинаковой способностью инициировать опухоль и формировать метастазы. Сегодня достоверно показано, что такими свойствами обладает небольшая популяция особых клеток, называемых стволовой клеткой опухоли (СКО). СКО — это специфическая опухолевая клетка, долгоживущая и медленно пролиферирующая, способная при трансплантации иммунодефицитным животным инициировать рост опухоли, идентичной исходной. СКО характеризуются чрезвычайной терапевтической устойчивостью, которая в ответ на лечение только возрастает. Регрессия опухоли и длительная ремиссия после лечения зависят от уничтожения этой самой важной части опухолевых клеток.

В обзоре обсуждаются пути возникновения опухоли, характерные особенности СКО, ее роль в метастазировании и терапия, направленная на СКО.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, стволовая клетка опухоли, маркеры стволовой клетки, терапия стволовой клетки опухоли

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-8-17

THERAPIES TARGETING CANCER STEM CELLS OF THE TUMOR: THE ONE AND ONLY HOPE

A.A. Vartanian, K.A. Baryshnikov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse., Moscow, 115478, Russia

The basic problem in cancer treatment remains the identification of cells responsible for maintaining the whole population of cells in a tumor. For decades it has been considered that all transformed cells within a tumor have carcinogenic potential with unlimited proliferation capacity and metastases formation. At present, the concept of cancer stem cell was introduced indicating that tumor evolves from a small population of long-live and slow proliferating cells. These cells have the capacity to initiate the tumor formation in immunodeficient animals. Among their properties, resistance to standard oncology treatments leads to treatment failure and cancer recurrence. The management and eradication of different types cancer is completely depended on removal of this cell population.

Current review presents basic information about cancer stem cell, particularly, the initiation of tumor, the peculiar properties of cancer stem cell, the role of cancer stem cell in metastasis formation and discusses therapeutic strategies targeted cancer stem cell.

Key words: cancer stem cell, cancer stem cell markers, therapeutic strategies targeted cancer stem cells

Введение

До недавнего времени в онкологии господствовала теория онкогенеза и метастазирования опухолей, постулирующая клоногенность всех раковых клеток, т. е. способность любой клетки опухоли давать начало новой опухоли [1]. Однако к настоящему моменту уже появилось значительное количество доказательств альтернативной иерархической теории, утверждающей, что опухоли построены по тому же принципу, что и нормальная ткань, и включают опухолевые клетки различной степени дифференцировки. Согласно второй модели опухоли формируются

из специальных опухолевых клеток. Эти клетки, по-видимому, появляются из нормальных стволовых клеток (СК) в результате злокачественной трансформации СК или их прямых потомков. Возникновение мутаций в СК, их наследование клетками-родоначальниками, а также неадекватный ответ СК на внешние сигналы могут приводить к превращению здоровых СК в опухолевые. Этот тип клеток получил название «стволовые клетки опухоли» (СКО) [2]. Концепция СКО сводится к следующему: СКО — это специфическая опухолевая клетка, долгоживущая и медленно пролиферирующая, способная при

трансплантации иммунодефицитным животным инициировать рост опухоли, идентичной исходной, в то время как другие короткоживущие и более дифференцированные клетки опухоли этой способностью не обладают. СКО характеризуются чрезвычайной терапевтической устойчивостью. Какой бы вид противоопухолевой терапии ни применялся (радио-, химио-, иммунотерапия, таргетная), СКО будут погибать последними, когда все дифференцированные раковые клетки уже успешно побеждены. Наличие такой чрезвычайной выживаемости СКО объясняет практически неминуемый рецидив заболевания на фоне успешной редукции солидных опухолей под воздействием современных форм химиотерапии. Предполагается, что СКО лежат в основе «дремлющих» опухолей, которые годами и даже десятилетиями после хирургической резекции или радио-/химиотерапии ждут, чтобы однажды возродить опухоль после того, как она когда-то была излечена [3]. Становится очевидным, что снижение размеров опухоли в результате лечения не столь уж и важно, гораздо важнее судьба СКО, потому что если они уцелели, то опухоль вернется в ближайшее время.

Возникновение опухоли: концепция стволовой клетки опухоли

Долгие годы возникновение злокачественной опухоли укладывалось в рамки стохастической теории канцерогенеза, суть которой сводилась к последовательному накоплению мутаций в соматических клетках организма, не передающихся по наследству. При случайном стечении обстоятельств, когда число мутаций становилось критическим, происходило злокачественное перерождение клетки. Согласно этой модели все клетки опухоли обладают одинаковой способностью инициировать опухоль и формировать метастазы. Настойчивые попытки выявить наиболее типичные изменения наследственного аппарата клетки с целью поиска потенциальных мишеней, воздействуя на которые можно было бы добиваться подавления роста опухоли, привели к осознанию факта, что набор генетических поломок индивидуален не только для каждого типа опухоли, но и для различных популяций клеток внутри одной опухоли. Не укладывалось в эту теорию и возникновение рака в первые годы жизни, у детей. Фундаментальной проблемой в исследовании рака продолжала оставаться идентификация клеток, способных инициировать и поддерживать рост опухоли. По мере накопления и анализа многочисленных случаев лечения пациентов со злокачественными новообразованиями методами химио-, радио- и таргетной терапии, направленной на уничтожение пролиферирующих клеток опухоли, становилось ясно, что, хотя выбранные стратегии казались перспективными и состояние

некоторых больных улучшалось, в какой-то момент болезнь неизбежно возвращалась. Подобное поведение опухоли можно было объяснить, предположив, что, для того чтобы выживать и приспосабливаться к постоянно меняющимся условиям, опухолевым клеткам необходимы свойства СК. Это и бессмертие, и способность к самообновлению, и способность формировать разные популяции родственных, но отличающихся друг от друга опухолевых клеток. Будучи истинно СК, они (и только они) будут способны к неограниченному числу делений и постоянному самовоспроизведению. Поскольку любое новообразование развивается только из активно делящейся клетки, наиболее подходящие кандидаты для злокачественной трансформации – нормальные тканевые СК, так как они характеризуются длительным сроком жизни и высокой скоростью деления. Этот тип клеток получил название СКО. Оказалось, что буквально все проблемы в клинической онкологии, начиная от возникновения множественной лекарственной устойчивости до появления рецидивов спустя десятилетия после кажущегося исцеления, связаны именно с этими клетками. Многие вопросы, на которые не было ответа долгие годы, сегодня находят объяснение в рамках этой модели. Так, концепция СКО объясняет, почему СК рака молочной железы ни при каких обстоятельствах не станет СК рака почки, СК рака предстательной железы не станет СК рака легкого и т. д., и наоборот. Концепция СКО объясняет также, почему в разных тканях злокачественные опухоли встречаются с разной вероятностью. Большинство дифференцированных клеток, составляющих основную массу ткани или органа, живут не слишком долго. Поэтому, даже если они накопят много потенциально онкогенных мутаций, клетка погибнет раньше, чем успеет спровоцировать рак. СК, напротив, живут долго, много раз делятся и могут дать начало опухоли. Чем больше клеточных делений осуществилось в популяции СК, тем больше вероятность того, что онкогенная мутация сработает в ее потомках. Так, самые редкие опухоли возникают в костях головы, таза и предплечья – и действительно, СК здесь самые неактивные. Чаще всего они делятся в базальном слое эпителия (за счет базального слоя происходит обновление кожи), а также в толстой и прямой кишке – опухоли в этих тканях относятся к самым распространенным [4]. Концепция СКО также хорошо согласуется с общепринятым фактом, что хронические, нелеченные воспалительные процессы часто переходят в рак [5]. В очаге хронического разрушения, как правило, происходит усиленная регенерация поврежденных тканей, и эту функцию выполняет тканевая СК. На каком-то этапе в программе СК может произойти сбой, и СК превращается в СКО.

Возникновение СКО из тканевой СК — не единственный способ появления СКО. При определенных условиях терминально дифференцированная клетка может дедифференцироваться до СК. В 2012 г. Нобелевская премия была присуждена британцу Джону Гердону из кембриджского Гердоновского института и японцу Синъя Яманака из Университета Киото за открытие возможности перепрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные [6]. С учетом повышенной гипоксии и за кислениости опухоли, недостаточного поступления питания из-за далеко не совершенной системы кровоснабжения опухоли подобная дедифференцировка опухолевой клетки в СКО не кажется такой уж невозможной. По всей видимости, такое поведение опухолевой клетки является еще одной составляющей, увеличивающей число СКО в опухоли.

Гистологические наблюдения за одной из опухолей мозга — медуллобластомой — показали, что ее клетки морфологически очень напоминают клетки эмбрионального мозжечка, на основании чего было выдвинуто предположение, что эта форма опухолей мозга развивается из зародышевого остатка, состоящего из медуллобластов, утративших способность к дифференцировке [7]. Так была выдвинута гипотеза о том, что эмбриональные СК могут находиться в тканях взрослых людей, сохраняя способность к канцерогенезу в случае их соответствующей стимуляции. На ранней стадии развития эмбриона клетки взаимозаменяемы и очень быстро делятся. После какого-то количества делений клетки могут возникнуть трудности в достижении терминальных стадий дифференцировки, что приведет к увеличению вероятности их малигнизации. Одним из подтверждений вышесказанного является экспрессия раково-эмбриональных антигенов опухолевыми клетками [8].

В 2006 г. American Association for Cancer Research (AACR) ввела следующее определение СКО: «клетка, способная к самообновлению и поддерживающая гетерогенные популяции в опухоли» (cancer stem cell is a cell within a tumor that possesses the capacity of self-renew and to cause the heterogenous lineages of cancer cells that comprise the tumor) [9].

Как отмечалось выше, основной характерный признак СКО — способность инициировать опухоль значительно меньшим количеством опухолевых клеток. Однако некоторые новообразования, отличающиеся экстремальной злокачественностью, например различные злокачественные меланомы, при которых доля активно делящихся опухолевых клеток приближается к половине опухолевой массы, могут содержать 10 или даже 25 % СК, инициирующих опухоль. Более того, фенотип этих СКО может быть различным [10].

На сегодняшний день СКО описаны практически для всех типов онкологических заболеваний. Для

СКО меланомы характерен фенотип CD20⁺, CD133⁺, CD271⁺, ABC B5⁺; для СКО рака мозга — CD133⁺; рака легкого — CD44⁺, CD133⁺; рака поджелудочной железы — CD24⁺, CD44⁺, ESA⁺; рака молочной железы — CD44⁺, CD24⁺; рака головы и шеи — CD24⁺, CD44⁺, ESA⁺; рака желудка — CD44⁺; рака печени — CD24, CD44⁺, CD90⁺, CD133⁺, ESA⁺; рака толстой кишки — CD24⁺, CD44⁺, CD133⁺, CD166⁺, ESA⁺; для СК лейкоза — CD34⁺, CD38⁺, CD47⁺, CD96⁺ [11].

Хотя анализ экспрессии поверхностных маркеров позволяет охарактеризовать популяцию клеток, ответственных за инициацию конкретной опухоли, картина, которую наблюдают клиницисты, может не всегда согласоваться с этой концепцией. Например, при меланоме популяция СК меланомы может быть гетерогенной, и совсем необязательно, чтобы все клетки популяции СК меланомы экспрессировали CD20, CD133, CD271. Может наблюдаться разное сочетание экспрессии CD20, CD133 или CD271.

Стволовая клетка опухоли и метастазирование

По мере развития (и в особенности под воздействием радио- и химиотерапии) в первичной опухоли происходит генерация «вторичных» СКО. Скорее всего, эти частично дифференцированные «вторичные» СКО и участвуют в метастазировании. По мере прогрессии, особенно под воздействием различных средств терапии, численность «вторичных» СКО возрастает. Качественные характеристики метастатических СКО, отличающие их от «первичной» СКО, во многом неясны. Новые методы исследований позволили обнаружить, что к образованию метастазов способно не более 10 % циркулирующих в кровотоке опухолевых клеток [12]. Вероятно, большая часть диссеминированных опухолевых клеток стареет или уходит в апоптоз, и лишь доли процента таких клеток образуют вторичные опухоли, снабженные сосудистой сетью. Следует отметить, что частота переключения фенотипа с инвазивного на пролиферативный (phenotype switching) крайне низка, что объясняет ремиссию ряда злокачественных заболеваний в течение длительного времени [13]. И это, возможно, является одной из причин, почему у многих пациентов наблюдается огромное число микрометастаз, не развившихся до состояния макрометастазирующих опухолей.

Недавно было обнаружено, что метастатические клетки экспрессируют специфические гены, которые, вероятно, держат их в «дремлющем», недифференцированном состоянии и делают неуязвимыми для иммунитета. Так, было установлено, что в меланоме активация гена *NEDD9* напрямую связана с метастатическим потенциалом клетки [14]. Другим заметным событием в метастазировании является амплификация хромосомы 6 [15]. Повышение числа копий

хромосомы 6 наблюдается более чем в 35 % метастатических меланом, и это связано с плохим прогнозом. Таким образом, оказалось, что различные клетки опухоли обладают резко отличающимися способностями проникновения в кровотоки и лимфоток и иницирования метастазов. Иными словами, генетическая программа, которая заставляет клетки метастазировать, не зависит от генетики родительской СКО. Не существует также зависимости метастазирования от размеров опухоли: некоторые опухоли, первичный узел которых бывает еле виден, дают обширные метастазы по всему организму. В то же время ряд опухолей (например, базалиома) метастазов не дает [16]. Новые высокоэффективные противоопухолевые препараты заметно сокращают объем первичной опухоли, но большинство этих препаратов не работает против метастазов.

Почему стволовая клетка опухоли резистентна к стандартной терапии?

По мере получения и анализа экспериментальных данных о прогрессии опухоли становилось ясно, что характерная для нормальных СК иерархическая организация имеет место и в популяции клеток любой опухоли. Более того, СКО сохраняют многие свойства нормальных СК, в том числе те, которые делают СК устойчивой к внешним воздействиям. В настоящее время устойчивость самых разных опухолей к терапии в значительной мере объясняют гиперэкспрессией ABC-транспортёров [17].

Белки семейства АТФ-зависимых ABC-транспортёров в норме защищают клетку от экзогенных и эндогенных токсинов, участвуют в транспорте АТФ, стероидов, полипептидов [18]. Устойчивость самых разных опухолей к терапии в значительной мере определяется тем, что СКО сохраняют присущую нормальным СК экспрессию ABC-транспортёров. Повышение уровня ABC-транспортёров в СКО способствует быстрому выведению из клетки различных опасных для нее веществ, в том числе и противоопухолевых препаратов, необходимых для успешной терапии. Так, было показано, что блокада ABC B5 моноклональными антителами или нокдаун этого гена посредством малых интерферирующих РНК приводили к ингибированию роста опухоли в экспериментальной модели меланомы, восстанавливали чувствительность опухоли к доксорубину и 5-фторурацилу и заметно снижали способность к метастазированию [19].

Второй механизм терапевтической устойчивости СКО связывают с повышенной экспрессией фермента альдегиддегидрогеназы. В норме функция этого белка — окисление токсичных для организма альдегидов до карбоновых кислот. В СКО он инактивирует многие противоопухолевые препараты [20].

В исследованиях последних лет неоднократно было показано, что ионизирующее излучение приводит к гибели основной массы опухолевых клеток, вызывая двухцепочечные разрывы в ДНК. Однако СКО сохраняет жизнеспособность благодаря повышению активности процессов репарации, и исход вызванного облучением повреждения ДНК в СКО смещен к выживанию в СКО, тогда как нестволовые опухолевые клетки подвергаются апоптозу. Более того, опухоли, подвергшиеся ионизирующей радиации, показывают значительное увеличение СКО [21].

СКО отличаются экстремальной устойчивостью к апоптозу. Именно поэтому СКО не погибают, например, после тяжелого ионизирующего облучения или высокодозной цитотоксической терапии, вместо этого они активизируют восстановление повреждений ДНК и через какое-то время вновь приобретают способность к делению [22]. Более того, как было показано совсем недавно, даже в тех случаях, когда удается добиться апоптоза СКО, эти клетки при определенных условиях способны к обратной «самосборке» с полным восстановлением функций и усилением злокачественности [23]. В тех же случаях, когда системы резистентности к терапии дают сбой, СКО переходят в статус «дремлющей» (dormant) клетки, в котором они могут находиться длительно — от нескольких лет до десятилетий, после чего способны активироваться и обуславливать рецидив. «Дремлющие» СКО отличаются низким уровнем метаболизма, повышенной устойчивостью к цитотоксической терапии и практически не экспрессируют поверхностные антигены, которые могли бы послужить мишенями для создания таргетных препаратов. На сегодняшний день «дремлющие» СК представляют наибольшую трудность в лечении онкологических больных. Еще одним фактором, заставляющим СКО перейти в состояние обратимого покоя («дремлющая»), является дефицит питательных веществ, индуцирующий интенсивную аутофагию [24]. Подобные клетки способны выйти из этого состояния и продолжить активный рост и пролиферацию при изменении тканевого микроокружения, например при появлении доступа к питательным веществам.

Другой особенностью СКО является устойчивость к окислительному стрессу [25]. Известно, что в ходе нормального метаболизма в клетке постоянно образуются активные формы кислорода. Нарушение баланса между количеством образующихся свободных радикалов и способностью антиоксидантной системы клетки нейтрализовать их может привести к возникновению окислительного стресса в клетке, который сопровождается повреждением макромолекул и запуском апоптотических процессов. В последние годы пристальное внимание уделяется способности активных форм кислорода выполнять функции

мутагенов и стимулировать дифференцировку СК [26]. Тканевая СК обладает довольно высокой устойчивостью к окислительному стрессу вследствие увеличенной экспрессии ряда антиоксидантных ферментов по сравнению с дифференцированными клетками. Оказалось, что подобными свойствами обладает и СКО: для реализации способности к самообновлению СКО поддерживает низкий уровень активных форм кислорода, что достигается благодаря высокой антиоксидантной энзиматической активности, небольшому числу митохондрий в клетках и низкому уровню потребления кислорода. Таким образом, чрезвычайная выживаемость СКО объясняется сохранением СКО многих свойств, присущих нормальным СК, — это большая продолжительность жизни в состоянии покоя, экспрессия АВС-транспортёров, устойчивость к апоптозу, высокий уровень антиоксидантных ферментов, конститутивно активная аутофагия.

Терапия, направленная на стволовую клетку опухоли

Если предположить, что за развитие злокачественного процесса отвечает лишь крайне небольшое число СКО, способных давать начало опухолевому процессу, непрерывно пополняя популяцию клеток опухоли и регенерируя ее после удаления или разрушения большинства ее клеток, то СКО может являться весьма перспективной мишенью терапевтического воздействия.

В настоящее время клинические испытания идут в нескольких направлениях в зависимости от терапии. Она может быть направлена:

- на микроокружение опухоли,
- блокаду эмбриональных сигнальных систем,
- блокаду АВС-транспортёров,
- индукцию апоптоза в СКО,
- дифференцировку СКО.

Терапия, направленная на микроокружение опухоли

Внимание исследователей на протяжении десятилетий было сфокусировано на мутациях внутри клетки, и только в последние годы стали рассматриваться вопросы, каким образом мутированные клетки могут взаимодействовать с находящимися рядом с ними клетками. Опухоли — нечто большее, чем просто пролиферирующие опухолевые клетки. Это сложные ткани, состоящие из многих различных клеточных типов, участвующих в гетеротипических взаимодействиях друг с другом. Сигнальные взаимодействия между опухолевыми клетками и их стромой развиваются в ходе всего многоуровневого становления опухоли. Микроокружение СКО очень разнообразно. В него входят фибробласты, мезенхимальные клетки, адипоциты, макрофаги, кровеносные сосуды, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы.

Эти сигнальные молекулы не только поступают извне, но и секретируются самими опухолевыми клетками. Например, они выделяют фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), воздействующий на соседние эндотелиальные клетки, и запускают рост новых сосудов. Диалог между микроокружением и СКО при некоторых условиях может способствовать прогрессии опухоли, влияя на ее агрессивность и способность диссеминироваться по всему организму. Все больше подтверждений находит идея о том, что именно неспособность нормальной СК адекватно взаимодействовать со своим окружением приводит к перерождению ее в СКО [27].

Недавно было показано, что практически во всех СК рака молочной железы активен ген хемокинового рецептора — CXCR4 [28, 29]. Были получены убедительные данные, свидетельствующие в пользу того, что взаимодействие между СКО и стромой осуществляется посредством активации SDF-1 α /CXCR4 сигнального пути, и если лишить СКО этой возможности, то можно предотвратить дальнейшее ее распространение и рецидив злокачественного новообразования. Следует отметить, что высокая экспрессия этого рецептора наблюдается также в нормальных СК, нейронах, эндотелиальных клетках. Связывание хемокина с рецептором в норме обеспечивает миграцию, инвазию и пролиферацию клеток [30, 31]. Следующим этапом исследования в этой области стало создание низкомолекулярных ингибиторов и антител к CXCR4. Доклинические исследования AMD3100 (Plerixafor), моноклональных антител к CXCR4, показали, что AMD3100 ингибировал рост клеток при остром лимфобластном лейкозе, а также снижал рост глиобластомы [32, 33]. При этом AMD3100 не влиял на общую выживаемость животных с экспериментальным метастатическим мелкоклеточным раком легкого. STCE-9908, другой антагонист CXCR4, снижал объем опухоли и появление метастазов у больных эзофагальной карциномой [34] и ингибировал появление метастазов при раке предстательной железы [35].

NOX-A12, наиболее изученный блокатор хемотаксиса, индуцированный SDF-1 α , вызывал повышение хемочувствительности опухолевых клеток к цитотоксическому лечению при хроническом лимфобластном лейкозе [36].

Ангиогенез опухоли, формирование кровеносных сосудов в опухоли на основе уже существующих в ткани сосудов, является необходимым условием для роста опухоли. За последние годы более 40 антиангиогенных препаратов прошли II и III фазы клинических испытаний, и некоторые из них при комбинировании с химиотерапией способствовали регрессии опухоли, уменьшая плотность сосудов в опухоли [37]. Следует отметить, что микроокружение СКО — это

не только различные типы клеток, участвующие в гетеротипических взаимодействиях друг с другом и с СКО, но также глубокая гипоксия. Антиангиогенная терапия опухоли, снижая доставку питания в опухолевую ткань, вместе с тем снижает также поступление кислорода в опухоль и тем самым повышает гипоксию в опухоли, создавая идеальные условия для выживаемости СКО. Об этом в одном из своих последних интервью в 1980 годах предупреждал Дж. Фолкман — основоположник антиангиогенной терапии опухолей.

Другой потенциальной мишенью, связанной со стромой опухоли, является повышенный внеклеточный pH. Было показано, что бикарбонат натрия способен тормозить переход опухоли из статуса *in situ* в инвазивный рост [38].

Чрезвычайно важно не забывать, что существующие терапевтические подходы, направленные на стро-му, не являются специфическими для СКО, они модифицируют также микроокружение нормальной СК. Понимание динамического равновесия СКО/строма, возможно, станет ключевым для развития новых стратегий, направленных на уничтожение СКО.

Терапия, направленная на блокаду эмбриональных сигнальных путей

Одним из важных открытий фундаментальной онкологии последних лет является обнаружение факта, что онкогенез и эмбриогенез используют одни и те же сигнальные пути, которые участвуют в регулировании процессов пролиферации клеток при органогенезе. В динамике развития эмбриона регуляция многих процессов осуществляется с участием сигнальных путей Notch, Hedgehog и Wnt/ β -catenin. Их активация в СК или реактивация в дифференцированных клетках лежит в основе многих типов рака.

Из 3 сигнальных путей наиболее изучен сигнальный путь Notch. В процессе эмбриогенеза Notch контролирует становление билатеральной симметрии. Этот высоко консервативный внутриклеточный сигнальный путь активируется при взаимодействии трансмембранных лигандов семейств Jagged (Jagged 1 и 2) и Delta (Delta-like 1, 3 и 4) с рецепторами Notch (Notch1–4). После связывания с лигандом активация рецептора Notch происходит за счет протеолитического действия γ -секретазы путем высвобождения внутриклеточного домена, который мигрирует в ядро и, образуя комплекс с ДНК, выполняет функцию транскрипционного регулятора экспрессии ряда генов [39]. Накоплен большой клинический материал, указывающий, что активация сигнального пути Notch способствует становлению глиомы, рака молочной железы, панкреатической железы, колоректального рака, меланомы, рака легких, различных онкогематологических заболеваний [40]. Активация сигнального

пути Notch служит также триггером для прогрессии опухоли в более агрессивный фенотип. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что блокирование сигнального пути Notch ингибиторами γ -секретазы приводило к снижению роста опухоли, индукции апоптоза, даун-регуляции ММП-2 и 9 и, как результат, снижало метастазирование [41, 42]. При блокаде сигнального пути Notch с помощью ингибиторов γ -секретазы в опухолевых клетках рака мозга было обнаружено снижение доли CD133-положительных клеток (СКО) в 5 раз. Уровень апоптоза был также выше — почти в 10 раз [42]. Продолжаются клинические испытания с антителами к DLL-4 и Notch-1 [43].

Другим эмбриональным сигнальным путем является сигнальная система Hedgehog (Hh). У взрослых активность сигнального пути Hh сильно снижена по сравнению со стадией эмбрионального и неонатального развития и обнаруживается лишь в СК нейронов центральной нервной системы и в эпителии кишечника, но этот сигнальный путь гиперактивирован при глиобластоме, раке молочной железы, поджелудочной железы, множественной миеломе и хроническом миелолейкозе [44]. Кроме того, сигнальный путь Hh вовлекается в эпителиально-мезенхимальный переход и поддержание жизнеспособности СКО [45]. Эти данные заставили искать для лечения таких опухолей низкомолекулярные ингибиторы сигнальной системы Hh. Наиболее известный препарат, ингибирующий систему Hh, — циклопамин (Cyclopamine) — был получен из полевого выюнка. Препарат ингибировал сигнальный путь Hh *in vitro* и обладал противоопухолевой активностью при базально-клеточной карциноме (результаты II фазы испытаний) [46]. На стадии клинических исследований I и II фазы находятся низкомолекулярные ингибиторы сигнального пути Hh висмодегиб (Vismodegib), BMS-833923, саридегиб (Saridegib, IPI-926), PF-04449913, LY2940680, LEQ 506 и TAK-441 [47]. Предварительные данные указывают на противоопухолевую активность препаратов в режиме монотерапии при медуллобластоме, опухолях головного мозга и раке предстательной железы.

До последнего времени не было сведений об участии сигнального пути Wnt/ β -catenin в поддержании жизнеспособности СКО. Первым экспериментальным подтверждением представлений о том, что контроль процессов самообновления и дифференцировки СКО находится под контролем Wnt/ β -catenin сигнального пути, явилась работа B.Y. Liu и соавт. [48]. Этот сигнальный путь, как оказалось, deregулирован при лейкозах, раке толстой кишки, раке молочной железы, меланоме [49]. Ингибиторы Wnt/ β -catenin сигнального пути включают низкомолекулярные ингибиторы (нестероидные противовоспалительные препараты, аспирин, производные витамина А и Д,

индометацин) и биологические ингибиторы (моноклональные антитела, малые интерферирующие РНК, рекомбинантные белки). Предварительные клинические исследования указывают на то, что моноклональные антитела OMP-54F28 и OMP-18R5 снижают популяцию СКО при раке легкого, раке молочной железы, раке поджелудочной железы [49].

Все 3 эмбриональных сигнальных пути, которые могут быть реактивированы при различных злокачественных заболеваниях, содержат большое число белков, участвующих в сложно регулируемых системах передачи сигналов в ядро клетки. Как показали результаты предварительных клинических испытаний, блокирование эмбриональных сигнальных путей на фоне краткосрочного улучшения состояния больного вызывало сильные побочные эффекты.

Терапия, направленная на ABC-транспортеры

Инициация и поддержание роста опухоли — не единственные функции СКО. С этой популяцией клеток связывают также низкую эффективность терапии. Одним из основных механизмов резистентности СКО к терапии является повышенный уровень экспрессии ABC-транспортеров. Эти белки локализованы преимущественно в плазматической мембране клетки и отвечают за транспорт полезных веществ в клетку и выведение из нее токсичных метаболитов и ксенобиотиков [50, 51]. Идея терапии, направленной на ABC-транспортеры, сводится в настоящее время к следующему: ингибиторы ABC-транспортеров выступают как соединения, повышающие чувствительность СКО к циторедуктивной терапии. Первое поколение ингибиторов ABC-транспортеров было направлено на интоксикацию ABC B1 или р-гликопротеин. В эту группу соединений входили блокатор кальциевых каналов верапамил, иммуносупрессор циклоспорин А и антиэстроген тамоксифен. Следует отметить, что эффективность этих препаратов была невысокой и наблюдались выраженные побочные эффекты [52]. Второе поколение ингибиторов ABC-транспортеров: Elacridar (GF120918), Dofequidar (MS-209), Valspodar (PSC833), Biricodar (INCEL, VX-710) и Timcodar (VX-853) — были менее токсичны, чем ингибиторы первого поколения, однако также наблюдалось неселективное блокирование ABC-транспортеров других клеток [53]. Третье поколение — Zosuquidar (LY335979), OC144093 (ONT-093), Laniquidar (R101933) и Tariquidar (XR-9576) — более селективные ингибиторы ABC B1, ABC C1, ABC G2 [53]. Эти препараты находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Следует отметить, что экспрессия ABC-транспортеров характерна и для нормальных клеток. Например, ABC B1 в норме обнаруживается в почках, надпочечниках, капиллярах мозга и плаценте, а ABC

G2 — в протоках молочных желез, гематопоетических СК и гематоэнцефалическом барьере [54]. Отличие лишь в том, что в СКО активность этих белков и уровень их экспрессии значительно выше, чем в норме. И многие исследователи рекомендуют с осторожностью подходить к этому виду терапии.

Терапия, направленная на индукцию апоптоза

Программированная гибель клеток представляет собой активный механизм клеточной гибели. Апоптоз вызывается как физиологическими сигналами (специфическими «киллерными» цитокинами), так и различными внутриклеточными повреждениями, в частности нарушениями структуры ДНК, нехваткой факторов роста, гипоксией, действием радиации, ультрафиолетового излучения и т. д. Экстремальная «живучесть» СКО определяется гиперэкспрессией сурвивина, антиапоптотического белка, препятствующего запуску программированной клеточной гибели [55]. Индукция апоптоза в СКО («убить СКО») позволила бы значительно повысить эффективность терапии онкологических больных, и с этим видом терапии связывают большие надежды.

Было показано, что комбинированная терапия TRAIL и Cytarabine или Daunorubicin значительно снижала число клеток-предшественников при остром миелолейкозе [56]. Комбинирование TRAIL с Bortezomid, ингибитором протеасом, вызывало апоптоз в СКО глиобластомы [57]. Комбинированная терапия TRAIL с цисплатином заметно повышала жизнеспособность больных при тройном негативном раке молочной железы [58].

Продолжаются клинические испытания индукции апоптоза в СКО с использованием в качестве мишени NF- κ B — транскрипционного фактора, контролирующего блокаду апоптоза, прогрессию опухоли, метастазирование и ангиогенез. Предварительные результаты указывают на то, что низкомолекулярные ингибиторы NF- κ B Parthenolide, Pyrrolidinedithiocarbamate и Diethyldithiocarbamate снижали популяцию СК рака молочной железы [58].

Терапия, направленная на дифференцировку стволовой клетки опухоли

Как отмечалось выше, традиционная противоопухолевая терапия вызывает апоптоз в дифференцированных клетках и не влияет на судьбу СКО. Этот факт позволил поднять вопрос о дифференцировке СКО как промежуточной стадии в снижении прогрессии опухоли.

Ретиноевая кислота и ее аналог ATRA в настоящее время широко используются для лечения острого миелолейкоза. В. Sampos и соавт. в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показали эффективность ATRA на редукции СК глиомы [59, 60]. С. Ginestier и соавт.

показали, что ретиноевая кислота вызывает дифференцировку СК рака молочной железы [61]. Аналогичный эффект был обнаружен и при воздействии на СКО ингибиторов гистондеацетилазы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на СК рака молочной железы [62]. Недавно Y. Dong и соавт. показали, что ингибитор тирозинкиназ иматиниб вызывает дифференцировку СКО глиобластомы [63].

Доклинические и предварительные результаты клинических испытаний указывают на то, что индукция дифференцировки СКО в комбинации с традиционной цитотоксической терапией существенно уменьшает популяцию СКО. Этот путь терапии, направленный на СКО, согласно последним данным, вызывал меньше всего побочных эффектов. Возможно, удастся создать препараты, которые избирательно заставят СКО интенсивно дифференцироваться и тем самым лишат их способности к самообновлению.

Создание препарата для таргетного воздействия на СКО представляет новую стратегию выбора, но вместе с тем и большую проблему: остается нерешенным вопрос о сохранении неустойчивости нормальных СК.

Заключение

По уровню смертности злокачественные новообразования пока еще уступают сердечно-сосудистым заболеваниям, однако страх перед раком со всей его непредсказуемостью остается выше. Видимо, это и заставляет ученых всего мира непрерывно корректировать свои представления о механизмах возникновения и прогрессирования болезни. Исследования

последних лет привели нас к осознанию факта, что относительная устойчивость опухоли к терапии в целом и длительность ремиссии в значительной мере определяются количеством СКО в опухоли. Терапия, направленная на элиминирование СКО, только начинает развиваться — это и индукция апоптоза в СКО, и целенаправленная доставка цитотоксического препарата, и блокада эмбриональных сигнальных путей Notch, Hedgehog и Wnt/ β -catenin, и ингибирование ABC-транспортеров в СКО. На сегодняшний день зарегистрированы и продолжаются более 60 клинических испытаний I и II фазы [63], направленные на СКО. Некоторые результаты клинических исследований обнадеживают. Однако в большинстве случаев предварительные данные клинических испытаний оказались несколько иными, чем ожидалось: избежать повреждений тканевой СК не удавалось. Дополнительные сложности в решении задачи вносит также возможность перехода стволовых клеток в нестволовые.

И все же есть надежда, что нам удастся уничтожить именно СКО. Пока мы слишком мало знаем о СКО. Мы знаем, откуда они происходят, иногда мы знаем про какие-то особенности таких клеток. Однако сегодня мы уже знаем, что уничтожить рак до того, как возникнет резистентность к терапии, невозможно: устойчивые к терапии клетки образуются задолго до начала терапии. И завтра, когда мы будем знать больше о СКО, возможно, нам удастся выйти на диалог с ней. А сегодня единственно разумной представляется идея перевода острого смертельного заболевания в хроническое (to live with cancer as chronic disease).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Greavis M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481(7381):306–13. DOI: 10.1038/nature10762. PMID: 22258609.
2. Eaves C.J. Cancer stem cells: here, there, everywhere? *Nature* 2008;456(7222):581–2. DOI: 10.1038/456581a. PMID: 19052611.
3. Osisami M., Keller E.T. Mechanisms of Metastatic Tumor Dormancy. *J Clin Med* 2013;2(3):136–50. DOI: 10.3390/jcm2030136. PMID: 26237067.
4. Tomasetti C., Vogelstein B., Parmigiani G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(6):1999–2004. DOI: 10.1073/pnas.1221068110. PMID: 23345422.
5. Arnold K.M., Opdenaker L.M., Flynn D. et al. Wound healing and cancer stem cells: inflammation as a driver of treatment resistance in breast cancer. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:1–13. DOI: 10.4137/CGM.S11286. PMID: 25674014.
6. Nobel Prize in medicine awarded to Sir John Gurdon and Shinya Yamanaka. *www.cnn.com/2012/10/08/world/europe/sweden-nobel-prize-medicine*.
7. Gate D., Danielpour M., Bannykh S. et al. Characterization of cancer stem cells and primary cilia in medulloblastoma. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2015;14(5):600–11. PMID: 25921740.
8. Epping M.T., Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006;66(3):398–403. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604494. PMID: 18648365.
9. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66(19):9339–44. DOI: 10.1158/0008-5472. PMID: 16990346.
10. Gurouard S.D., Murphy G.F. Melanoma stem cell: not rare, but well done. *Lab Invest* 2010;90:33–49. DOI: 10.1016/j.mam.2013.10.003. PMID: 24145241.
11. Dragu D.L., Necula L.G., Bleotu C. et al. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells* 2015;7(9):1185–201. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i9.1185. PMID: 26516409.
12. Paoletti C., Hayes D.F. Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol* 2016;882:235–58. DOI: 10.1007/978-3-319-22909-6. PMID: 26987538.
13. Azevedo A.S., Follain G., Patthabhiraman S. et al. Metastasis

- of circulating tumor cells: favorable soil or suitable biomechanics, or both? *Cell Adh Migr* 2015;9(5):345–56. DOI: 10.1080/19336918.2015.1059563. PMID: 26312653.
14. Ahn J., Sanz-Moreno V., Marshall C.J. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin $\beta 3$ and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 7):1814–26. DOI: 10.1242/jcs.101444. PMID: 22328516.
15. North J.P., Vetto J.T., Murali R. et al. Assessment of copy number status of chromosomes 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. *Am J Surg Pathol* 2011;35(8):1146–50. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318222a634. PMID: 21716079.
16. Hoorens I., Vossaert K., Ongenaes K. et al. Is early detection of basal cell carcinoma worthwhile? *Br J Dermatol* 2016;174(6):1258–65. DOI: 10.1111/bjd.14477. PMID: 26872563.
17. Abdullah L.N., Chow E.K. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med* 2013;2(1):3. DOI: 10.1186/2001-1326-2-3. PMID: 23369605.
18. Linton K.J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 2015;43(5):1003–10. DOI: 10.1042/BST20150132. PMID: 26517915.
19. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005;65(10):4320–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3327. PMID: 15899824.
20. Januchowski R., Wojtowicz K., Zabel M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother* 2013;67(7):669–80. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.03.011. PMID: 23602050.
21. Chang L., Graham P., Hao J. et al. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget* 2016;7(10):11002–17. DOI: 10.18632/oncotarget.6760. PMID: 26716904.
22. Skvortsov S., Debbage P., Lukas P. et al. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Semin Cancer Biol* 2015;31:36–42. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.06.002. PMID: 24954010.
23. He Y.C., Zhou F.L., Shen Y. et al. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):8335–51. DOI: 10.3390/ijms15058335. PMID: 24823879.
24. Ojha R., Bhattacharyya S., Singh S.K. Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis. *Biores Open Access* 2015;4(1):97–108. DOI: 10.1089/biores.2014.0035. PMID: 26309786.
25. Wang K., Zhang T., Dong Q. et al. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis* 2013;4: e537 – e346. DOI: 10.1038/cddis.2013.50. PMID: 23492768.
26. Sato A., Okada M., Shibuya K. et al. Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res* 2014;12(1):119–31. PMID: 25473894.
27. Teicher B.A., Fricker S.P. CXCL12(SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2927–2931. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329. PMID: 20484021.
28. Domanska U.M., Kruijzinga R.C., Nagengast W.B. et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur J Cancer* 2013;49:219–230. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.05.005. PMID: 22683307.
29. Sun Y., Mao X., Fan C. et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol* 2014;35:7765–7773. DOI: 10.1007/s13277-014-1816-1. PMID: 24810923.
30. Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–348. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.005. PMID: 15882617.
31. Sánchez-Martín L., Sánchez-Mateos P., Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med* 2013;19(1):12–22. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.10.004. PMID: 23153575.
32. Welschinger R., Liedtke F., Basnett J. et al. Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice. *Exp Hematol* 2013;41:293–302. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.11.004. PMID: 23178377.
33. Rios A., Hsu S.H., Blanco A. et al. Durable response of glioblastoma to adjuvant therapy consisting of temozolomide and a weekly dose of AMD3100 (plerixafor), a CXCR4 inhibitor, together with lapatinib, metformin and niacinamide. *Oncoscience* 2016;3(5–6):156–63. DOI: 10.18632/oncoscience.311. PMID: 27489862.
34. Drenckhan A., Kurschat N., Dohrmann T. et al. Effective inhibition of metastases and primary tumor growth with CTCE-9908 in esophageal cancer. *J Surg Res* 2013;182:250–256. DOI: 10.1016/j.jss.2012.09.035. PMID: 23117118.
35. Wong D., Kandagatla P., Korz W. et al. Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis. *BMC Urol* 2014;14:12. DOI: 10.1186/1471-2490-14-12. PMID: 24472670.
36. Hoellenriegel J., Zboralski D., Maasch C. et al. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* 2014;123:1032–1039. DOI: 10.1182/blood-2013-03-493924. PMID: 24277076.
37. Jayson G.C., Kerbel R., Ellis L.M. et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 2016;388(10043):518–29. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01088-0. PMID: 26853587.
38. Baranyi M., Lippai M., Szatmári Z. Role of the stroma in the initiation and progression of tumors. *Orv Hetil* 2015;156(45):1816–23. DOI: 10.1556/650.2015.30294. PMID: 26522855.
39. Schwanbeck R., Martini S., Bernoth K. et al. The Notch signalling pathway: molecular basis of cell content dependency. *Eur J Cell Biol* 2011;90(6–7):572–581. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.10.004. PMID: 21126799.
40. Koch U., Radtke F. Notch signaling in solid tumor. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:367–409. DOI: 10.1016/S0070-2153(10)92013-9. PMID: 20816403.
41. Vartanian A., Gatsina G., Grigorieva I. et al. The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry. *Clin Exp Med* 2013;13(3):201–9. DOI: 10.1007/s10238-012-0190-9. PMID: 22627943.
42. Fan X. γ -Secretase inhibitor-resistant glioblastoma stem cells require RBPJ to propagate. *J Clin Invest* 2016;126(7):2415–8. DOI: 10.1172/JCI88619. PMID: 27322058.
43. Yen W.C., Fischer M.M., Axelrod F. et al. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin Cancer Res* 2015;21:2084–2095. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0432. PMID: 25934888.
44. Cohen D.J. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am* 2012;26:565–588. DOI: 10.1016/j.hoc.2012.01.005. PMID: 22520980.
45. Merchant A.A., Matsui W. Targeting Hedgehog-a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16:3130–3140. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2846. PMID: 20530699.
46. Chen J.K. I only have eye for ewe: the discovery of cyclopamine and development of Hedgehog pathway-targeting drugs. *Nat Prod Rep* 2016;33(5):595–601. DOI: 10.1039/c5np00153f. PMID: 26787175.
47. Yang T. and Rycak K. Targeted therapy against cancer stem cells. *Oncol Lett* 2015;10:27–33. PMID: 26170972.

48. Wënd P., Holland J.D., Ziebold U. et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:855–863. DOI: 10.1016/j.semcdb. 2010.09.004. PMID: 20837152.
49. Yang K., Wang X., Zhang H. et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest* 2016;96(2):116–36. DOI: 10.1038/labinvest. 2015.144. PMID: 26618721.
50. Le P.N., McDermott J. D., Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther* 2015;146:1–11. DOI: 10.1016/j.pharmthera. 2014.08.005. PMID: 25172549.
51. Abdullah L.N., Chow E.K. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med* 2013;17:3–14. DOI: 10.1186/2001-1326-2-3. PMID: 23369605.
52. Minderman H., O'Loughlin K.L., Pendyala L. et al. VX-710(biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin Cancer Res* 2004;10:1826–1834. PMID: 15014037.
53. Kuhlmann J.D., Hein L., Kurth I. et al. Targeting Cancer Stem Cells: Promises and Challenges. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(1):38–58. PMID: 26179271.
54. Liang Y., Li S., Chen L. The physiological role of drug transporters. *Protein Cell* 2015;6(5):334–50. DOI: 10.1007/s13238-015-0148-2. PMID: 25797421.
55. Fukuda S., Pelus L.M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006;5(5):1087–98. PMID: 16731740.
56. Plasilova M., Zivny J., Jelinek J. et al. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002;16:67–73. PMID: 11840265.
57. Unterkircher T., Cristofanon S., Vellanki S.H. et al. Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. *Clin Cancer Res* 2011;17:4019–4030. DOI: 10.1158/1078–0432. CCR-11–0075. PMID: 21525171.
58. Yin S., Xu L., Bandyopadhyay S. et al. Cisplatin and TRAIL enhance breast cancer stem cell death. *Int J Oncol* 2011;39:891–898. DOI: 10.3892/ijo. 2011.1085. PMID: 21687939.
59. Zhou J., Zhang H., Gu P. et al. NFkappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stemlike cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:419–427. PMID: 17965935.
60. Campos B., Wan F., Farhadi M. et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* 2010;16:2715–2728. DOI: 10.1158/1078–0432. CCR-09–1800. PMID: 20442299.
61. Ginestier C., Wicinski J., Cervera N. et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 2009;8:3297–3302. PMID: 19806016.
62. Salvador M.A., Wicinski J., Cabaud O. et al. The histone deacetylase inhibitor abexinostat induces cancer stem cells differentiation in breast cancer with low Xist expression. *Clin Cancer Res* 2013;19:6520–6531. DOI: 10.1158/1078–0432. CCR-13–0877. PMID: 24141629.
63. Dong Y., Han Q., Zou Y. et al. Long-term exposure to imatinib reduced cancer stem cell ability through induction of cell differentiation via activation of MAPK signaling in glioblastoma cells. *Mol Cell Biochem* 2012;370:89–102. DOI: 10.1007/s11010-012-1401-0. PMID: 22829019.

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. В. Мисюрин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;
ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Андрей Витальевич Мисюрин cyclon@nm.ru

Для выявления причины патологического состояния, установления диагноза и контроля эффективности лечения у больных онкогематологическими заболеваниями используют методы молекулярной диагностики. В результате хромосомных перестроек в опухолевых клетках при гемобластозах либо возникают химерные онкогены, либо активируется гиперэкспрессия важных регуляторных генов. Это принципиальное различие в исходе хромосомных перестроек необходимо учитывать при разработке молекулярно-генетических диагностик. Методы молекулярной диагностики существенно превосходят в чувствительности другие подходы, поэтому они очень эффективны при выявлении остаточных опухолевых клеток и для раннего выявления рецидива.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, полимеразная цепная реакция в реальном времени, транслокация, химерный онкоген, минимальная остаточная болезнь, лейкомия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-18-24

ESSENTIALS OF THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

A. V. Misyurin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;
«Genotechnology»; 104 Profsoyuznaya St., Moscow, 115478, Russia

Molecular genetic and molecular biology methods enable one to reveal pathogenetic basis of oncohematological diseases, they are particular useful for diagnostic purposes, to control and evaluate treatment efficiency. In leukemia patients there are two different types of chromosomal anomalies: some of them give rise for chimeric oncogenes, others activate hyperexpression of regulatory genes. It is necessary to take into account this difference in order to properly develop molecular genetic tests. Molecular tests are more sensitive to compare with other approaches, due to this fact they are especially useful to monitor residual leukemia cells and for early detection of relapse.

Key words: polymerase chain reaction with reverse transcription, real-time polymerase chain reaction, translocation, chimeric oncogene, minimal residual disease, leukemia

Введение

Методы молекулярной диагностики в онкогематологии применяются для выявления причины патологического состояния, установления диагноза и контроля эффективности лечения на уровне геномной ДНК, РНК и белков. При этом в основе подавляющего большинства современных методов молекулярной диагностики лежат 3 простых природных явления.

Во-первых, комплементарное взаимодействие нуклеиновых кислот, за счет которого можно осуществлять гибридационное связывание изучаемого образца ДНК или РНК со специфической пробой (зондом) [1]. На этом принципе основаны такие важные методы, как гибридизация по Саузерну [2, 3] и Нозерн-гибридизация [4], анализ экспрессии генов

при помощи олигонуклеотидных микрочипов [5]. Кроме того, олигонуклеотиды, комплементарные изучаемому участку ДНК, применяют при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР, polymerase chain reaction – PCR) [6] и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, Real Time PCR, RQ PCR) [7]. Анализ первичной последовательности ДНК (секвенирование), который дает прямую информацию о нарушениях структуры генов, в настоящее время также проводят с использованием комплементарных олигонуклеотидов (модифицированный метод Сэнгера, секвенирование нового поколения) [8–10]. На основе принципа комплементарного взаимодействия цепей ДНК работает метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [11],

без которого невозможно представить современную цитогенетическую диагностику. При помощи совокупности этих методов можно выявлять клинически значимые маркеры, проводить поиск новых генных маркеров, характерных для различных заболеваний системы кроветворения, а также определять количество опухолевых клеток в костном мозге и периферической крови, что очень важно для оценки эффективности лечения гемобластозов.

Во-вторых, используется способность иммунной системы высших организмов производить особые белки – антитела, которые могут специфически взаимодействовать с различными молекулами и молекулярными комплексами. При помощи гибридной технологии можно получать моноклональные антитела с заданной специфичностью и в необходимом количестве. Специфические антитела применяют для определения иммунофенотипа клеток. При этом с помощью антител окрашивают мазки крови и костного мозга или анализируют связавшие антитела клетки при помощи проточного цитофлуориметра [12]. Кроме того, специфические антитела используют при проведении иммуноферментного анализа [13], анализа белков при помощи вестерн-блоттинга [14]. С помощью антител определяют группы крови [15], иммунную совместимость доноров и реципиентов костного мозга [16].

В-третьих, ряд методов молекулярной диагностики базируется на способности особых ферментов – эндонуклеаз рестрикции, или рестриктаз, – расщеплять ДНК в характерных нуклеотидных последовательностях (сайтах), узнавание которых определено специфичностью применяемой рестриктазы. Открытие этих ферментов в начале 1970 годов заложило основы нового раздела экспериментальной молекулярной биологии – генетической инженерии [17–19]. При помощи рестриктаз и специфических зондов, комплементарных изучаемому участку геномной ДНК, можно выявлять мутации генов, приводящие к развитию наследственных или онкологических заболеваний.

Общие принципы молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний

Молекулярно-биологические методы применяются для установления диагноза, составления прогноза, оценки эффективности и определения тактики лечения гемобластозов. Результаты исследований, проведенных при помощи молекулярных методов, не противоречат, но существенно дополняют канонические цитоморфологические и цитохимические критерии диагностики.

Аномальный иммунофенотип определяют при помощи проточной цитофлуориметрии. Использование широкой панели антител дает возможность определить природу опухолевых клеток, установить

правильный диагноз, без чего невозможно проведение адекватного лечения. Кроме того, проточная цитофлуориметрия применяется и для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Классические методы цитогенетического анализа позволяют получить неоценимую информацию при установлении диагноза в дебюте заболевания. Диагностика гемобластозов стала более надежной с появлением специфических молекулярных зондов, при помощи которых можно проводить FISH-анализ и выявлять хромосомные aberrации даже в неделящихся клетках. Кроме того, метод FISH позволяет с высокой чувствительностью обнаруживать остаточные опухолевые клетки, что крайне необходимо при мониторинге МОБ.

Применение молекулярных методов, в особенности ПЦР, для диагностики гемобластозов стало возможным в результате накопления данных о молекулярных механизмах возникновения этих заболеваний. В настоящее время охарактеризованы многие генетические дефекты, которые приводят к неопластической трансформации кроветворных клеток. Были исследованы на молекулярном уровне области слияния материала разных хромосом, которые обмениваются своими частями в результате многочисленных повторяющихся транслокаций – маркеров гемобластозов, которые ранее были исследованы и классифицированы с помощью цитогенетических методов.

Оказалось, что существуют 2 принципиально разных варианта структурных перестроек в случае как транслокаций, так и инверсий. Так, некоторые гены оказываются вблизи точек разрыва и приобретают порой такое новое соседство, которое коренным образом изменяет характер их работы, но структура этих генов обычно остается прежней. Если же разрыв происходит внутри самих генов, то в результате возникают гены-химеры, получающиеся путем слияния без сдвига рамки считывания последовательностей разных генов. Таким образом, в первом случае не возникает слитых между собой генов, они только пространственно сближаются, а малигнизация клеток зависит от количественных параметров работы таких генов и их взаимного влияния. Во втором случае образуется слитный новый ген, сохраняющий лишь некоторые важные черты своих предшественников.

Молекулярная диагностика онкомаркеров, которые активируются при гемобластозах одним из двух описанных выше способов, проводится по-разному.

В первом случае диагностику при помощи ПЦР проводят на основе данных о структуре геномных точек разрыва, если они возникают у разных больных, в пределах разрешающей способности ПЦР, определяемой максимальным размером фрагмента

ДНК, который может синтезировать полимеразу. В этом случае анализируемым материалом является препарат геномной ДНК, выделенной из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. Кроме того, диагностику можно осуществлять, определяя уровень экспрессии структурно не измененного онкогена, но в процессе хромосомных перестроек оказавшегося гиперэкспрессированным в результате сближения его промоторной области с энхансером гена, который в норме был расположен в другой хромосоме. Для количественной оценки уровня экспрессии таких онкомаркеров применяют метод ПЦР-РВ. При этом в качестве исследуемого материала используют тотальную РНК, выделенную из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. При помощи фермента обратной транскриптазы РНК превращается в кДНК, которая затем служит матрицей в ПЦР-РВ. При этом способ количественной оценки зависит от того, каким контрольным материалом располагает исследователь. Примером заболевания, при котором происходит активация онкогена, но не меняется организация его структурной части, может служить лимфома Беркитта [20]. При этом заболевании в 90 % случаев малигнизация В-лимфоцитов происходит в результате транслокации t(8;14)(q24;q32). Данная транслокация приводит к сближению гена *c-MYC* из хромосомы 8 с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов из хромосомы 14 [21]. Близость энхансеров генов цепей иммуноглобулинов ведет к повышенной экспрессии гена *c-MYC* [22]. Молекулярную диагностику этого заболевания проводят по оценке уровня экспрессии гена *c-MYC* и при помощи анализа геномных точек разрыва [23].

При 2-м варианте активации протоонкогенов, вызывающих развитие гемобластозов, происходит существенная структурная перестройка, в результате которой возникают химерные онкогены. Структурные особенности химерных онкогенов — маркеров гемобластозов определяют тактику проведения молекулярной диагностики. Как правило, в этих случаях рутинная диагностика при помощи ПЦР-амплификации областей геномной ДНК, содержащих точки разрыва, оказывается невозможна, так как геномные точки разрыва индивидуальны у разных больных и возникают в случайных местах обширных интронных последовательностей. Клонирование и изучение геномных точек разрыва у таких больных до сих пор граничат с искусством, поэтому проводятся исключительно в рамках фундаментальных исследований и не применяются для целей диагностики. При созревании м-РНК химерных онкогенов большое разнообразие, существующее на уровне геномных точек разрыва у разных больных, несущих одну и ту же хромосомную перестройку, нивелируется за счет

природного механизма — сплайсинга. В итоге все сводится к образованию нескольких основных вариантов зрелой м-РНК химерного онкогена, которые могут выявляться у разных больных. В настоящее время диагностику химерных онкогенов при гемобластозах проводят не по геномной ДНК, а по детекции точек слияния экзонов генов-партнеров, которые участвуют в образовании химерного онкогена. Для этого используют метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, reverse transcription PCR — RT-PCR), чувствительность которого позволяет выявлять даже 1 опухолевую клетку среди 10 000–1 000 000 нормальных (чувствительность 10^{-4} – 10^{-6}). При этом всего 2 или 3 системы праймеров позволяют исследователю при помощи ОТ-ПЦР проводить определение основных вариантов того или иного химерного онкогена. Например, при помощи 2 систем праймеров можно выявлять при помощи ОТ-ПЦР 2 основных типа м-РНК химерного онкогена *PML-RARa* (варианты *bcr3* и *bcr1*), а также редкий вариант *bcr2 PML-RARa* (при помощи той же диагностической системы, которую применяют для обнаружения варианта *bcr1*) [24–26]. Таким же образом при помощи ОТ-ПЦР проводят диагностику химерных онкогенов *BCR-ABL* типов p190 и p210 (разные виды транслокации t(9;22) — маркеры острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и хронического миелолейкоза (ХМЛ)); *MLL-AF9*, *MLL-AF4*, *MLL-ENL*(t(9;11), t(4;11), t(11;19) — маркеры ОЛЛ); *E2A-PBX1*, *SIL-TAL1*, *TEL-AML1*(t(1;19), del(1)(p32;p32), t(12;21) — маркеры ОЛЛ); *AML1-EVT1*, *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*(t(3;21), t(8;21), inv(16;16) — маркеры острого миелобластного лейкоза [24–28]. Обнаружение у пациента методом ОТ-ПЦР характерного химерного онкомаркера служит основанием для постановки соответствующего диагноза. Последующие определения экспрессии этого онкомаркера у данного больного в костном мозге или периферической крови позволяют оценить эффективность лечения. При некоторых нозологиях, например при ХМЛ и остром промиелоцитарном лейкозе, проводимое лечение может привести к полному исчезновению молекулярного сигнала, несмотря на очень высокий уровень чувствительности диагностики с помощью ОТ-ПЦР. В этом случае говорят о достижении молекулярной ремиссии. Последующий мониторинг тем же методом позволяет вовремя зафиксировать момент молекулярного рецидива, когда вновь будет выявляться экспрессия химерного онкогена, причем до наступления цитогенетического и гематологического рецидива. Эта информация дает возможность провести упреждающее терапевтическое воздействие и предотвратить развитие гематологического рецидива. Сочетание современных методов терапии лейкозов, позволяющих достичь молекулярной ремиссии, и высокочувствительной молекулярной

диагностики стимулирует поиск эффективных способов лечения молекулярных рецидивов.

Обычный метод ОТ-ПЦР, который дает только качественную информацию о наличии или отсутствии экспрессии химерных онкогенов, все больше уступает место сочетанию с ПЦР-РВ. При помощи ПЦР-РВ можно определить, с какой скоростью и какой глубины достигает снижение молекулярного сигнала, соответствующего экспрессии онкомаркера и связанного с изменением в процессе лечения объема опухолевой массы. Чувствительность этого метода сравнима с чувствительностью ОТ-ПЦР, но при этом ПЦР-РВ позволяет оценить количественно динамику убывания/роста опухолевого клона даже при полном цитогенетическом ответе. Скорость и амплитуда снижения/нарастания молекулярного сигнала, полученного при помощи ПЦР-РВ, становятся одними из главных показателей эффективности лечения лейкозов.

Большое разнообразие видов лейкозов затрудняет проведение эффективного мониторинга МОБ, так как не всегда удается выявить для конкретного пациента уникальный опухолевый маркер. В связи с этим весьма перспективным представляется внедрение в диагностическую практику методов оценки МОБ по анализу универсальных опухолевых маркеров. Одним из наиболее предпочтительных универсальных маркеров гемобластозов на сегодняшний день является онкомаркер WT1 [29, 30]. Перспективным маркером является также онкомаркер PRAME, с которым связаны некоторые особенности клинических проявлений лейкозов [25, 30–32].

Ценную прогностическую информацию для лечения гемобластозов можно получить, если параллельно с определением основного маркера анализировать при помощи молекулярно-биологических методов изменение работы некоторых других генов.

Показано, что при диагностике острого промиелоцитарного лейкоза целесообразно исследовать не только основной маркер PML-RARa, но и оценивать повышение уровня экспрессии и определять частичную дупликацию гена *FLT3* – факторы неблагоприятного прогноза [33]. Кроме того, низкий уровень экспрессии онкомаркера PRAME является прогностическим фактором раннего рецидива острого промиелоцитарного лейкоза [25]. При ОЛЛ и остром миелобластном лейкозе неблагоприятным прогностическим маркером является частичная дупликация гена *MLL*, выявляемая при помощи ОТ-ПЦР [34]. Молекулярная диагностика эритремии оказывается более надежной, если не только оценивать при помощи ПЦР-РВ гиперэкспрессию гена *PRV-1*, но и определять ассоциированную с этим заболеванием точечную мутацию гена *Jak2*-киназы [35–37]. Очень эффективен мониторинг МОБ опухолей

лимфатической природы с помощью анализа уникальных перестроек генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [38]. Успех пересадки стволовых клеток при лечении гемобластозов во многом зависит от молекулярного анализа приживления клеток донора и поведения остаточных клеток реципиента. При этом можно оценивать поведение опухолевого клона по анализу характерного маркера, если он был выявлен до проведения трансплантации. Но даже при отсутствии такого маркера клетки донора и реципиента можно различить при помощи молекулярного анализа мультиаллельных STR- и VNTR-полиморфизмов, которые используются также в качестве косвенных маркеров при семейном анализе наследственных патологий и для идентификации личности [39].

РНК- и ДНК-маркеры онкогематологических заболеваний являются важными независимыми прогностическими факторами, позволяющими оценить вероятность достижения и продолжительность полной ремиссии. Кроме того, в зависимости от наличия у больного того или иного молекулярного маркера может существенно изменяться общая, бессобытийная и безрецидивная выживаемость. Молекулярно-генетический анализ, направленный на выявление характерных РНК- и ДНК-маркеров, позволяет проводить обоснованный выбор терапевтической тактики, а также судить об эффективности терапии, оценивая скорость и глубину достижения молекулярного ответа.

В результате лечения онкогематологического заболевания происходит постепенное уменьшение количества опухолевых клеток. При этом современные методы лечения позволяют достичь более значительного снижения числа опухолевых клеток в сравнении с методами терапии недавнего прошлого. Еще 15–20 лет назад лечение онкогематологических заболеваний было в основном симптоматическим, а опухолевые клетки на всех этапах терапии можно было видеть в окрашенном мазке крови в обычный световой микроскоп, который стоял на столе каждого гематолога. Внедрение программ интенсивной химиотерапии и появление таргетных препаратов, направленных на подавление механизма молекулярного патогенеза, позволяет уменьшать количество опухолевых клеток в периферической крови и костном мозге до уровня, при котором морфологический анализ уже не обладает достаточной чувствительностью, чтобы эти клетки обнаружить. Был введен специальный термин – минимальная остаточная, или резидуальная, болезнь – остаточная популяция опухолевых клеток, выявить которую можно лишь по определенным хромосомным, иммунофенотипическим или молекулярным маркерам с помощью новых высокочувствительных методов, когда при световой микроскопии в костном мозге определяется не более 5 % бластных

клеток при нормальных показателях периферической крови и отсутствии экстрамедуллярных очагов [40–43]. Дальнейшее снижение уровня опухолевых клеток можно еще наблюдать при помощи проточной цитофлуориметрии и цитогенетического анализа, но и эти методы имеют чувствительность, не превышающую 10^{-2} . Когда возможности всех этих методов исчерпаны, единственным способом обнаружить сигнал, свидетельствующий о сохранении у больного минимального количества опухолевых клеток, является анализ молекулярных РНК- и ДНК-маркеров при помощи соответствующих технологических подходов [24–26, 40–43].

Стандартизация молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний

По мере обнаружения РНК- и ДНК-маркеров, отражающих важные особенности опухолевых клеток у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, ими пополняется набор параметров, подлежащих обязательному исследованию в дебюте заболевания и на различных этапах лечения. Для детекции РНК- и ДНК-маркеров чаще всего используют модификации методов ПЦР, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ [24–26].

Для проведения ПЦР исследователи разрабатывают собственные протоколы или опираются на протоколы, опубликованные в специализированных статьях. Уже в 90-е годы прошлого века было опубликовано множество протоколов ПЦР, предназначенных для выявления экспрессии химерных онкогенов — продуктов рекуррентных транслокаций, характерных для наиболее часто встречающихся видов лейкозов человека. Европейские специалисты в области молекулярной диагностики лейкозов предприняли попытку стандартизации применяемых ими методик. С этой целью они объединенными усилиями провели сравнение эффективности разных протоколов. В результате проведенной ими работы в 1999 г. в журнале *Leukemia* появилась публикация, в которой были представлены рекомендации по использованию метода ОТ-ПЦР с последующей электрофоретической детекцией для качественного анализа экспрессии наиболее распространенных химерных онкогенов (Протокол Biomed-1) [24]. Следующие по значимости рекомендации были опубликованы в том же журнале в 2003 г. (The Europe Against Cancer Program, EAC [44]). На этот раз речь шла о проведении количественного исследования экспрессии химерных онкогенов у больных лейкозами методом ПЦР-РВ.

После выхода на рынок препарата гливек для лечения ХМЛ [45, 46] компания Новартис и объединение европейских гематологов ELN (European Leukemia Net) учредили программу EUTOS (The European Treatment Outcome Study; <http://www.eutos.org>), целью которой явилось проведение стандартизации

молекулярных исследований экспрессии химерного онкогена *BCR/ABL* в крови и костном мозгу больных ХМЛ. Цели этой программы существенно отличались от целей, которые преследовали Biomed-1 и EAC. Во-первых, в программе EUTOS речь шла только об одной нозологической форме — ХМЛ. Во-вторых, в качестве молекулярного маркера рассматривалась только одна форма химерного онкогена *BCR/ABL* — *p210* в виде 2 наиболее часто встречающихся видов транскриптов — *BCR/ABL p210 b2a2* и *BCR/ABL p210 b3a2*. И в-третьих, самое существенное: от участников программы не требовали использования унифицированного протокола, предусматривающего одинаковые по составу праймеры и зонды, а также отсутствовали требования приобретать ферменты и прочие компоненты реакционных смесей у одних и тех же валидированных производителей. Это последнее обстоятельство связано с тем, что еще при использовании протокола EAC для диагностики ХМЛ было обнаружено, что даже при абсолютном совпадении условий проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени и используемых для этого реактивов результаты, которые получали в разных лабораториях при анализе одних и тех же клинических образцов, значительно различались, иногда на целый порядок. Однако при этом было обнаружено, что с поправкой на разброс, который был индивидуален для каждой лаборатории, медианы результатов отличались примерно на одну и ту же величину. Следовательно, ошибка методики была систематической и зависела не от различий в протоколах ПЦР, а от того, в каких именно лабораториях проводился анализ. В связи с этим в рамках программы EUTOS необходимо было рассчитать для каждой из участвующих в программе лабораторий поправочный коэффициент, который должен был приводить результаты, получаемые в каждой отдельной лаборатории, к размерности единой шкалы, выражающей относительную экспрессию гена *BCR/ABL*. Поправочный коэффициент называли фактором конверсии (conversion factor, CF), шкалу — Международной шкалой (International Scale), а единицы, получаемые после пересчета, получили обозначение IS [47, 48].

Ассоциация ELN проводит значительную работу по стандартизации методов цитогенетической и молекулярной диагностики не только ХМЛ, но и других распространенных видов лейкозов. Под эгидой ELN работает несколько постоянных подпрограмм, результаты которых рассматривают на ежегодных международных конференциях и воркшопах.

Выводы

Для онкогематологических заболеваний характерны разнообразные дефекты генетического аппарата стволовых кроветворных клеток. При этих

заболеваниях часто наблюдают хромосомные аномалии: транслокации, инверсии и делеции, — в результате которых происходит перераспределение генетического материала либо между разными хромосомами (транслокации), либо в пределах одной хромосомы (делеции и инверсии). На молекулярном уровне это выражается в том, что в месте слияния генетического материала из разных хромосомных локусов возникают так называемые химерные онкогены или же создаются условия для гиперэкспрессии важных регуляторных генов. Кроме того, точечные мутации, микроинсерции и микроделеции некоторых генов также могут быть причиной развития онкогематологических заболеваний. Прогрессирование опухолевых заболеваний системы крови происходит в результате появления дополнительных генетических дефектов, приводящих к формированию более агрессивных и резистентных опухолевых клонов.

Идентификация специфических молекулярных маркеров привела к пониманию тонких механизмов патогенеза и клинической гетерогенности онкогематологических заболеваний. На основе этих знаний разрабатываются терапевтические агенты направленного действия, с которыми связан сегодняшний значительный прогресс в лечении лейкозов и лимфом. Количественное определение молекулярных маркеров позволяет достоверно устанавливать диагноз, выбирать тактику терапии и судить об эффективности лечения злокачественных заболеваний системы кроветворных и лимфоидных тканей, а также своевременно выявлять признаки развивающегося молекулярного рецидива с целью предотвращения развития рецидива клинического. В связи с этим возникла необходимость в повсеместном применении специфических, высокочувствительных и количественных методов обнаружения и анализа молекулярных субстратов гемобластозов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Watson J.D., Crick F.H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953;171:737–38. DOI: 10.1038/171737a0. PMID: 13054692.
2. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98(3):503–17. DOI: 10.1016/S0022-2836(75) 80083–0. PMID: 1195397.
3. Southern E.M. Southern blotting. *Nat Protoc* 2006;1(2):518–25. DOI: 10.1038/nprot.2006.73. PMID: 1195397.
4. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5350–4. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5350. PMID: 414220.
5. Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S., Greene J.J. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8453–7. DOI: 10.1073/pnas.84.23.8453. PMID: 2446323.
6. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350–4. DOI: 10.1126/science.2999980. PMID: 2999980.
7. Pierce K.E., Wang L.J. LATE-PCR and allied technologies: real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Methods Mol Biol* 2011;688:47–66. DOI: 10.1007/978-1-60761-947-5_5. PMID: 20938832.
8. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:444–8. PMID: 1100841.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5463–7. PMID: 271968.
10. Shendure J., Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008;26:1135–45. DOI: 10.1038/nbt1486. PMID: 18846087.
11. Рубцов Н.Б. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* в анализе хромосомных аномалий. В кн.: Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний. Введение в молекулярную диагностику. Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева. М.: Медицина, 2011. Т. 2. С. 100–136.
12. Maecker H.T., McCoy J. Ph., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):191–200. DOI: 10.1038/nri3158. PMID: 22343568.
13. Lequin R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005;51(12):2415–8. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532. PMID: 16179424.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4350–4. PMID: 388439.
15. Wiener A.S. Principles of Blood Group Serology and Nomenclature: A Critical Review. *Transfusion* 1961;1(5):269–346. DOI: 10.1111/j. 1537–2995.1961.tb00063.x. PMID: 13785102.
16. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012 Jul;80(1):1–11. DOI: 10.1111/j.1399–0039.2012.01881.x. PMID: 22651253.
17. Arber W., Linn S. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* 1969;38:467–500. DOI: 10.1146/annurev.bi.38.070169.002343. PMID: 4897066.
18. Smith H.O., Wilcox K.W. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970 Jul 28;51(2):379–91. PMID: 5312500.
19. Danna K., Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68(12):2913–7. PMID: 4332003.
20. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *The British journal of surgery* 1968;46(197):218–23. PMID: 13628987.
21. Kornblau S.M., Goodacre A., Cabanillas F. Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 1991;9(2):63–78. PMID: 1869243.
22. Hecht J.L., Aster J.C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3707–21. PMID: 11054444.
23. Guikema J.E., Schuurin E., Kluin P.M. Structure and consequences of IGH switch

- breakpoints in Burkitt lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;39:32–6. DOI: 10.1093/jncimonographs/IGN020. PMID: 18647999.
24. Van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901–28. PMID: 10602411.
25. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):9–16.
26. Шуравина Е.П., Паровичникова Е.Н., Демидова И.А. и др. Мониторинг минимальной резидуальной болезни у больных острым промиелоцитарным лейкозом. *Терапевтический архив* 2006;78(7):25–31.
27. Мисюрин А.В., Суринов В.Л., Тагиев А.Ф. Новые точки разрыва транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе. *Биоорганическая химия* 1999;25(3):234–6.
28. Мисюрин А.В., Аксенова Е.В., Крутов А.А. и др. Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза. *Гематология и трансфузиология* 2007;52(2):35–40.
29. Kitamura K., Nishiyama T., Ishiyama K. et al. Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected by a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: a comparison with expression of WT1 mRNA in peripheral blood. *Int J Hematol* 2016;103(1):53–62. DOI: 10.1007/s12185-015-1882-1. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26520650.
30. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой. *Онкогематология* 2009;(2):52–5.
31. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе. *Терапевтический архив* 2004;76(7):77–81.
32. Ercolak V., Paydas S., Bagir E. et al. PRAME Expression and Its Clinical Relevance in Hodgkin's Lymphoma. *Acta Haematol* 2015;134(4):199–207. DOI: 10.1159/000381533. PMID: 26044287.
33. Lucena-Araujo A.R., Kim H.T., Jacomo R.H. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann Hematol* 2014;93(12):2001–10. DOI: 10.1007/s00277-014-2142-9. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24981688.
34. Ommen H.B., Hokland P., Haferlach T. et al. Relapse kinetics in acute myeloid leukaemias with MLL translocations or partial tandem duplications within the MLL gene. *Br J Haematol* 2014;165(5):618–28. DOI: 10.1111/bjh. 12792. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24611505.
35. Melis S., Vellinga S., Zachée P. et al. JAK2 V617F mutation and PRV-1 overexpression: relevance in the diagnosis of polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Acta Clin Belg* 2009;64(5):429–33. DOI: 10.1179/acb. 2009.070. PMID: 19999391.
36. Tutaeva V., Misurin A.V., Rozenberg J.M. et al. Application of PRV1- mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. *Hematology* 2007;12(6):473–9. DOI: 10.1080/10245330701384005. PMID: 17852451.
37. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелолипролиферативных заболеваний. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2009;2(3):211–9.
38. Shin S., Kim A.H., Park J. et al. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in the bone marrow of lymphoid neoplasia using BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction. *Int J Med Sci* 2013;10(11):1510–7. DOI: 10.7150/ijms. 5342. PMID: 24046525.
39. Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M. et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006;81(10):735–46. DOI: 10.1002/ajh. 20693. PMID: 16838323.
40. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:35–42. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.35. PMID: 23233558.
41. Paietta E. Should minimal residual disease guide therapy in AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 2015;28(2–3):98–105. DOI: 10.1016/j.beha.2015.10.006. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26590765.
42. Чельшева Е.Ю., Туркина А.Г., Мисюрин А.В., Захарова А.В. Раннее выявление цитогенетического рецидива при динамическом исследовании уровня BCR-ABL транскрипта у больного хроническим миелолейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2007;52(2):50–1.
43. Чельшева Е.Ю., Туркина А.Г., Мисюрин А.В. и др. Мониторинг минимальной остаточной болезни у больных хроническим миелолейкозом: клиническое значение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Терапевтический архив* 2007;79(4):49–52.
44. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H.J. et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17:2318–57. DOI: 10.1038/sj. leu. 2403135. PMID: 14562125.
45. Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2(5):561–6. PMID: 8616716.
46. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., et al.; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *Engl J Med* 2006;355(23):2408–17. DOI: 10.1056/NEJMoa062867. PMID: 17151364.
47. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Молекулярный мониторинг у пациентов с хроническим миелолейкозом: корреляция с цитогенетическим ответом, прогностическое значение, оценка ответа на терапию. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):151–9.
48. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):160–5.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ

А.А. Кескинов^{1,2}, М.Р. Шуринов², В.М. Бухман¹, З.С. Шпрах¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²Департамент патологии Университета г. Питтсбург; США, 15213, 3550 Terras стрит

Контакты: Антон Артурович Кескинов a.keskinov@yahoo.com

Иммунная система играет особую роль в развитии опухолевого процесса. С одной стороны, она способна бороться с раком с помощью врожденного и приобретенного звеньев, с другой стороны — опухоль может использовать иммунные клетки для защиты от противоопухолевого ответа. Дендритные клетки (ДК) являются основными антигенпредставляющими клетками и поэтому активно участвуют в развитии иммунного ответа на присутствие в организме опухолевых клеток. ДК способны захватывать опухолевые антигены и представлять их Т-клеткам, вызывая тем самым опухолеспецифический Т-клеточный ответ. Однако в большинстве случаев терапия рака с использованием препаратов ДК не позволяет достичь клинически значимого эффекта. Одна из основных причин — неблагоприятное воздействие на ДК микроокружения опухоли.

Важным этапом работы по улучшению методов биотерапии с использованием ДК является определение факторов, вызывающих нарушение функций ДК при раке, а восстановление нормальных функций ДК у онкологических больных представляет собой одну из основных задач иммунотерапии рака. В настоящем обзоре рассмотрены основные виды патологических изменений, которые происходят в ДК под влиянием опухоли.

Ключевые слова: иммуносупрессия, дендритная клетка, опухолевое микроокружение, регуляторная дендритная клетка, цитокин

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-25-33

PATHOPHYSIOLOGY OF DENDRITIC CELLS IN CANCER

A.A. Keskinov^{1,2}, M.R. Shurin², V.M. Bukhman¹, Z.S. Shprakh¹

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Department of pathology University of Pittsburgh; USA, 15213

Immune system plays a crucial role in tumor growth process. It exerts cancer surveillance function via innate and adaptive immune mechanisms, nonetheless tumor may exploit various immune cells to escape specific immune response. Dendritic cells are the primary antigen presenting cells, which mediate immune response against cancer cells. Dendritic cells are capable of processing and presenting tumor antigens to T cells, which results in tumor-specific T cell-mediated response. However, adoptive therapy with dendritic cells demonstrates poor clinical outcomes. Among a variety of factors, the impact of tumor microenvironment on dendritic cells may be the primary one. Therefore, tumor-derived factors, which lead to dendritic cells malfunction, may be the key target for improving dendritic cell-based therapy. Meanwhile, recovery of dendritic cell functions in cancer patients remains one of primary aims for cancer immunotherapy. This review outlines main types of tumor-induced dendritic cells dysfunctions in cancer.

Key words: immunosuppression, dendritic cell, tumor microenvironment, regulatory dendritic cell, cytokine

Введение

Проблема диагностики и лечения онкологической патологии сохраняет свою актуальность по причине значительного роста онкозаболеваний в общей структуре заболеваемости в Российской Федерации. Например, в 2014 г. было выявлено 566 970 новых случаев злокачественных новообразований, что на 21,1 % больше по сравнению с 2004 г. (468 029). На конец 2014 г. в территориальных онкологических учреждениях состояли на учете 3 291 035 больных (2013 г. — 3 098 855). Согласно данным Росгосстата, смертность

от злокачественных новообразований в 2014 г. составила 290 182 человека (198,7 случая на 100 тыс. населения).

Благодаря успехам фундаментальных исследований в медицинской среде сформировалось целостное понимание особой роли иммунной системы в онкологическом процессе. Очевидно, что одной из причин развития опухоли является нарушение нормального иммунного ответа. Однако опухоль представляет собой сложную биологическую систему, тесно связанную с организмом, в котором она возникла и развивается. При этом опухолевые клетки находятся

в окружении разнообразных по своей природе факторов, формирующих их микроокружение. К клеточным и гуморальным факторам относятся различные клетки и структуры, простые химические вещества и сложные макромолекулы, способные прямо и опосредованно влиять на иммунную систему больного.

Стимуляция ответа опухолеспецифических иммунокомпетентных клеток способна существенно ограничивать рост и распространение раковых клеток в организме. Но также известно о негативном влиянии микроокружения опухоли, которое напрямую поляризует иммунокомпетентные клетки в толерогенные подтипы благодаря секреции ряда факторов, тем самым усугубляя злокачественный процесс в организме больного.

В связи с этим особенно актуален поиск новых средств, направленных на устранение дисбаланса иммунной функции организма путем направленного воздействия на выведенные опухолью из строя иммунокомпетентные клетки.

Особая роль дендритных клеток в противоопухолевом иммунитете

Среди клеток иммунной системы дендритные клетки (ДК) являются ключевыми антигенпредставляющими клетками, которые участвуют в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета.

ДК в организме человека представлены гетерогенной популяцией клеток миелоидного ($CD4^+CD1a^+CD11c^{high}BDCA-1/CD1c^+$ и $CD4^+CD1a^-CD11c^{low}BDCA-3/CD141^+$, так называемые миелоидные ДК) и лимфоидного ($MHC\ II^+CD11c^-CD4^+CD45RA^+CD123^+ILT3^+ILT1^-$, так называемые плазмцитоподобные ДК) происхождения [1]. Ряд авторов также выделяют воспалительные ($HLA-DR^+CD11c^+BDCA1^+CD1a^+Fc\epsilon RI^+CD206^+CD172a^+CD14^+CD11b^+$) ДК, дифференцирующиеся из моноцитов *in situ* при воспалении [2–4].

Кроме того, ДК различаются по степени зрелости, что отражается в их способности выполнять главную функцию — представление антигенов. В соответствии с данным критерием можно выделить клетки-предшественники, незрелые клетки и зрелые ДК. Процесс созревания ДК сопровождается повышением экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса, костимуляторных молекул и секрецией провоспалительных цитокинов интерлейкина (ИЛ) 12, фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), ИЛ-1 и ИЛ-6 [5, 6].

В свою очередь, в контексте онкологических исследований ДК можно подразделить на функциональные (успешно выполняющие свои функции), функционально дефицитные и регуляторные [7]. Функционально дефицитные ДК обычно не обладают иммуносупрессорным действием, поскольку в равной

степени неспособны как к активации Т-клеток, так и к подавлению пролиферации активированных Т-клеток или усилению дифференцировки Т-клеток в Т-регуляторные клетки. Для регуляторных ДК характерны экспрессия маркеров PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD103 и ILT3/4, увеличение секреции иммунорегуляторных факторов и цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-1 β , трансформирующего ростового фактора бета (ТРФ- β), индоламин-2,3-диоксигеназы, аргиназы I, iNOS) и снижение секреции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-15, ФНО- α , ИЛ-1 α) [8–14]. В регуляторных ДК также отмечается снижение экспрессии CD11c, молекул ГКГС II класса и костимуляторных молекул CD80 и CD86 наряду с повышенным уровнем экспрессии CD11b [15, 16].

Биотерапия рака препаратами дендритных клеток

Важная роль ДК в обработке и презентации опухолевых антигенов антигенспецифическим Т-клеткам и иницировании противоопухолевого иммунного ответа была подтверждена в экспериментальных моделях и исследованиях на онкологических больных [17, 18]. Данный факт подтолкнул исследователей к мысли о целесообразности введения дополнительного количества ДК в организм больных с целью усиления иммунного ответа [19]. Таким образом получило развитие новое направление лечения онкологических больных — терапия вакцинами ДК.

Несмотря на то что вакцина ДК не является вакциной в классическом понимании этого термина, поскольку ее применение направлено не на предотвращение заболевания, а на стимуляцию противоопухолевого иммунного ответа, данное название закрепилось за этим методом иммунотерапии. В основе метода лежит введение ДК, нагруженных ассоциированными с опухолью антигенами *ex vivo*, с целью индукции клинически значимого противоракового иммунного ответа. Первые клинические испытания с использованием вакцин ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, были проведены в 1995–1996 гг. у пациентов с меланомой [20], лимфомой [21] и раком предстательной железы [22]. Полученные предварительные результаты были обнадеживающими — у многих пациентов развился иммунный ответ и отмечалась регрессия опухоли [23, 24]. К 2010 г. число пациентов, которым проводилась вакциноterapia ДК, увеличилось более чем в 3 раза [25, 26].

Однако, несмотря на доказанную индукцию иммунного ответа, в настоящее время большинство вакцин ДК демонстрирует весьма скромный клинический эффект [26]. Среди причин этого следует особо отметить комплексное влияние опухолевого микроокружения, состоящего из разрастающихся клеток эпителиального компонента опухоли и десмопластической стромы, которая включает стромальные

клетки, сосудистую сеть и инфильтрат иммунных клеток. Известно, что микроокружение опухоли активно воздействует не только на ДК, но и на другие иммунные клетки, вызывая патологические изменения, приводящие к снижению противоопухолевого ответа [27, 28].

Патологические изменения дендритных клеток при раке

Благодаря ряду исследований стали известны характерные виды патологических изменений ДК у онкологических пациентов. Эти исследования подтверждают способность опухоли оказывать угнетающее влияние на дифференцировку и функциональную активность ДК *in vitro* и *in vivo*. Именно вызванные опухолью изменения ДК в значительной степени определяют неполноценный противоопухолевый иммунитет и низкую эффективность различных методов иммунотерапии рака.

С точки зрения функциональной активности при раке выделяют 3 основных вида ДК: нормальные функционально полноценные ДК, способные инициировать и поддерживать противоопухолевый ответ; функционально дефицитные ДК, у которых подавлены подвижность, способность к захвату, обработке и презентации антигена; регуляторные иммуносупрессорные ДК, тормозящие Т-клеточный иммунный ответ.

В числе наиболее значимых изменений функций ДК при раке можно отметить:

- нарушение образования, дифференцировки и созревания ДК;
- индукцию апоптоза предшественников ДК и самих ДК;
- ингибирование презентации антигенов ДК;
- поляризацию ДК в иммуносупрессорные регуляторные ДК;
- нарушение миграции ДК.

Далее подробно остановимся на каждом из упомянутых патологических изменений.

Нарушение образования, дифференцировки и созревания дендритных клеток

По мере прогрессирования рака отмечается снижение количества ДК [29]. Например, при плоскоклеточном раке кожи наблюдается уменьшение числа резидентных ДК — клеток Лангерганса [30]. Неоднократно сообщалось о сокращении пула циркулирующих в периферической крови ДК у онкологических больных [31–34].

Также известно о негативном влиянии опухоли на процесс образования ДК (дендропоэз) [35, 36].

Например, было доказано, что совместное культивирование с опухолевыми клетками либо средой от них ингибирует образование ДК из моноцитов и гематopoэтических клеток-предшественников *in vitro*. Так, совместное культивирование гематopoэтических клеток-предшественников ДК с клетками нейробластомы приводит к значительному (до 90 %) ингибированию образования ДК *in vitro* [37]. Схожий эффект отмечается при совместном культивировании с клеточными линиями рака предстательной железы и рака легких [38]. Известно, что моноциты, выделенные от онкологических больных, отличаются низкой способностью дифференцироваться в зрелые ДК [39, 40]*.

Важно отметить, что ДК, образующиеся в организме больных раком, могут быть неспособны к полноценному созреванию. Например, ДК у пациентов с поздней стадией рака толстой и прямой кишки не экспрессируют маркеры созревания в ответ на стимуляцию липополисахаридом [41].

Одним из первых выявленных факторов, который ингибирует дифференцировку ДК при раке, был фактор роста эндотелия сосудов [42]. У больных раком толстой кишки количество ДК находится в обратной пропорциональной зависимости от уровня фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови. Среди других опухолевых факторов, негативно воздействующих на ДК, следует отметить ИЛ-6 [43], который контролирует экспрессию рецепторов макрофагального колониестимулирующего фактора на моноцитах и, следовательно, их дифференцировку в макрофаги, но не в ДК. Также сообщалось о влиянии секретируемого опухолью трансформирующего ростового фактора (ТРФ) на снижение экспрессии CD80 на ДК [44].

Анализ маркеров дифференцировки опухолевых ДК показал, что степень зрелости ДК может зависеть от локализации ДК в пределах опухоли. Так, при раке молочной железы незрелые CD1a⁺ ДК обнаруживаются в опухолевом ложе, в то время как зрелые CD83⁺DC–LAMP⁺ ДК выявляются в околоопухолевой зоне. Аналогично отмечается инфильтрация опухолевых узлов преимущественно CD1a⁺ ДК, в то время как перитуморально численно преобладают S-100⁺CD1a⁺ ДК. В инвазивном крае колоректальной карциномы зрелые CD83⁺ ДК формируют кластеры с Т-клетками, а незрелые CD1a⁺ ДК рассеяны и редко формируют кластеры с лимфоцитами. При плоскоклеточном раке (слизистой оболочки) полости рта [45], холангиоцеллюлярной карциноме [46], раке желчного пузыря [47], почечной аденокарциноме [48] опухолинфильтрующие ДК преимущественно характеризуются незрелым фенотипом.

*Данные автора этого не подтверждают (диссертация 2006 г.).

Индукция апоптоза предшественников и зрелых дендритных клеток

При совместном культивировании ДК и различных линий опухолевых клеток под воздействием выделяемых опухолью факторов отмечается время- и дозозависимый апоптоз в ДК. Более того, в опухолеинфильтрирующих ДК выявлен значительно более высокий уровень апоптоза, чем в ДК, полученных из селезенки тех же животных [49]. Ряд исследователей сообщали об индукции опухолью гибели клеток-предшественников ДК [50], ускорении раннего апоптоза ДК в опухолевом микроокружении [51] и наличии короткоживущих моноцитарных ДК у пациентов с распространенным раком [52, 53]. Уже на ранней стадии у пациенток с раком молочной железы в крови отмечается существенно большее количество апоптотически измененных ДК [54].

В активации апоптоза в ДК под влиянием опухоли участвует несколько сигнальных путей. Эти сигнальные пути регулируются белками Bcl-2, Bcl-xL, Bax, FLIP, цитохромом C и другими молекулами [55, 56]. Вместе с тем активация сигнальных путей CD40, ИЛ-15 и ФНО- α способна нарушать индуцированный опухолью апоптоз ДК [54, 57]. Среди выделяемых опухолью молекул, которые усиливают апоптоз ДК, можно отметить гиалуронан [58], ганглиозиды GM3 и GD3 [59], муцин [60], белок HMGB1 (амфотерин) [61] и другие факторы.

Нарушение функции дендритных клеток под влиянием опухоли

С начала 1990 годов ученые сообщали о нарушении способности представлять антигены клетками лимфатических узлов при раке [62]. G.M. Halliday и соавт. показали влияние опухоли на миграцию ДК к неопластическому очагу [63, 64]. Прогрессирование рака часто связано со снижением способности ДК к миграции внутрь опухолевого очага [65].

Сообщалось также о функциональных нарушениях ДК у пациентов с опухолями головы и шеи, в частности о неспособности формировать клеточные кластеры с аллогенными лимфоцитами [66, 67].

Ряд исследователей отмечают индуцированные опухолью нарушения способности ДК к стимуляции аллогенных и аутологичных Т-клеток, поглощению и презентации антигенов, экспрессии костимуляторных сигналов, ИЛ-12, ИЛ-15 и миграции в направлении различных хемокинов при раке легких, предстательной железы, почек, молочной железы, миеломе, меланоме, глиоме, лейкемии, нейробластоме и других типах опухолей [32, 36, 50, 52, 68]. Также было продемонстрировано влияние опухоли на снижение экспрессии костимуляторных молекул CD80 и CD86 [69]. Например, ДК из периферической крови и лимфатических узлов пациентов с раком молочной

железы экспрессируют низкие уровни HLA-DR и CD86 и секретируют меньше ИЛ-12 [70]. При раке молочной железы в ДК отмечается снижение экспрессии поверхностных маркеров CD1a, CD83, CD80, CD86 и CD54 [71]. В 1996 г. D.I. Gabrilovich показал, что выделенные у животных с опухолью ДК имеют ограниченную способность к презентации антигена и стимуляции Т-клеток [42, 72]. Известно, что выделяемый опухолью ТРФ- β индуцирует экспрессию лиганда PD-L1 (B7H1) на ДК в микроокружении опухоли [73], который способен вызывать подавление функции инфильтрирующих опухоль Т-клеток через рецептор PD-1 [74].

Функциональные нарушения отмечаются и при базальноклеточной карциноме кожи, где только 1–2 % внутриопухолевых и 5–10 % обнаруженных перитуморально ДК экспрессируют костимуляторные молекулы CD80 или CD86 [75]. Более того, даже при сохранении нормального уровня экспрессии CD80 и CD86 на ДК, полученных от пациентов с меланомой, стимуляция CD40L не вызывает усиления экспрессии CD80 [76].

Толерогенные подтипы дендритных клеток при раке

Функциональная поляризация является еще одним неблагоприятным последствием воздействия опухоли на ДК.

A. H. Enk и соавт. впервые показали потерю способности презентовать опухолевые антигены и индукцию толерантности к опухоли в ДК под влиянием секретируемых меланомой факторов [77].

Изначально считалось, что основной пул толерогенных ДК в опухолевом микроокружении составляют незрелые и плазмцитоподобные ДК.

Плазмцитоподобные ДК (B220⁺CD11c^{low}MHC-II⁺CD303⁺ (человек) и B220⁺CD11c^{low}MHC-II⁺CD317 (мышь)) представляют собой подтип ДК, который при воспалении секретирует интерферон I типа. Было показано, что плазмцитоподобные ДК (пДК) усиливают иммуносупрессию при гепатокарциноме путем повышения секреции ИЛ-10 CD4⁺Foxp3⁺ Т-клетками [78], в то же время при раке молочной железы и меланоме пДК связывают с регуляторным иммунным ответом по Th2 типу [79, 80]. Изначально пДК считали толерогенными клетками, хотя в настоящее время полагают, что их толерогенная функция зависит от клеточного микроокружения [81]. При колоректальной карциноме анализ инфильтрирующих опухоль FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток (Т-рег) и CD123⁺ плазмцитоподобных ДК показал, что опухоль гораздо сильнее инфильтрирована Т-рег, но количество пДК, напротив, было значительно выше в окружающих участках нормальной слизистой оболочки [82]. В сравнении с лимфатическими узлами без метастазов дренирующие метастатические лимфатические узлы содержали

большее число Т-рег и пДК. Эти данные свидетельствуют о возможном вкладе пДК в увеличение уровня Т-рег при колоректальной карциноме [82]. Кроме того, известно, что пДК в опухолевом микроокружении служат важным источником ICOS-L, являющегося лигандом к соответствующему рецептору, который экспрессируется на подавляющем большинстве FoxP3⁺ Т-рег в опухолевом микроокружении. Фактор ICOS необходим для усиления пролиферации и супрессорной функции Т-рег. ICOS⁺Foxp3⁺ Т-рег локализуются рядом с пДК, а их количество обычно прямо коррелирует с количеством пДК в опухоли. Например, при раке яичников количество пДК и Т-рег является важным прогностическим маркером [83]. Схожие данные были получены при изучении пациентов с раком желудка [84]. Согласно данным ряда исследований причиной негативного влияния ассоциированных с опухолью пДК может быть их ограниченная способность производить интерферон I, что, в свою очередь, усиливает их способность стимулировать пролиферацию Т-рег [85].

Со временем накопилось много данных, которые свидетельствуют о конверсии зрелых ДК в толерогенные ДК. Например, полученные от пациентов с раком молочной железы ДК независимо от стимула к созреванию (sCD40L, цитокиновый коктейль, ФНО-α и липополисахарид) преимущественно индуцируют образование Т-рег [86]. При совместном культивировании с аллогенными Т-клетками эти ДК стимулируют повышенную секрецию ТРФ-β1 и ИЛ-10. Поэтому в опухолевом микроокружении зрелые ДК, незрелые ДК, моноциты и миелоидные супрессорные клетки могут быть поляризованы в регуляторные ДК [13, 16]. В свою очередь поляризованные ДК могут путем контроля поляризации Т-клеток, миелоидных супрессорных клеток и Т-рег прямо и опосредованно ингибировать Т-клеточный иммунный ответ, приводя к усилению процесса роста опухоли [13].

При прогрессии опухоли незрелые ДК могут поступать в дренирующие лимфатические узлы и там селективно стимулировать пролиферацию Т-рег путем секреции ТРФ-β [87].

Клетки меланомы выделяют факторы, которые меняют антигенпрезентирующую функцию ДК и индуцируют толерантность по отношению к опухолевой ткани [77]. Регуляторные ДК при раке способны прямо и опосредованно поддерживать толерантность Т-клеток путем управления поляризацией Т-клеток, дифференцировкой и активностью миелоидных супрессорных клеток и Т-рег, создавая условия для формирования предраковых ниш [13]. При прогрессии опухоли незрелые ДК могут поступать в дренирующие лимфатические узлы и избирательно усиливать пролиферацию Т-рег через секрецию ТРФ [87]. При раке молочной железы также сообщалось

о поляризации ДК в клетки с регуляторным фенотипом, экспрессирующие ИЛ-10 и ТРФ-β, что, в свою очередь, приводит к экспансии популяции CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-рег [88]. При раке легких регуляторные ДК экспрессируют ИЛ-10, окись азота, фактор роста эндотелия сосудов и аргиназу I и ингибируют пролиферацию Т-клеток *in vitro* и *in vivo* [15]. Ряд данных свидетельствует об особой роли ФНО-α и простагландина E2 в увеличении экспрессии фермента индоламин-2,3-диоксигеназы в ДК в опухоли. Данный фермент блокирует пролиферацию Т-клеток [89].

Дополнительные факторы, влияющие на дендритные клетки при раке

При раке ДК находятся под влиянием секретруемых опухолью и клетками стромы факторов. Также выраженное воздействие на ДК оказывают уровни стрессовых гормонов, лекарства, комплексные дегенеративные процессы, сопровождающие старение организма, инфекции, аутоиммунные нарушения и другие острые и хронические заболевания. Например, психический стресс способен менять функциональную активность ДК, воздействуя через нейромедиаторы и нейропептиды [90, 91]. Биогенные амины, нейропептиды и глюкокортикоиды могут нарушать дифференцировку и активность ДК. Стрессиндуцированная регуляция иммунного ответа связана с экспрессией в ДК специфических рецепторов к пролактину, бомбезиноподобным пептидам, кальцитонин-ген-связанному пептиду, нейропептиду Y, субстанции P, опиоидным пептидам [92].

Обработанные глюкокортикоидами ДК демонстрируют большую активность эндоцитоза, снижение антигенпредставляющей функции и способности секретировать цитокины [93]. Норэпинефрин нарушает экспрессию ИЛ-12 и повышает уровень ИЛ-10 в ДК, что негативно сказывается на способности ДК к презентации антигенов и хемотаксису [94].

Также известно о влиянии на жизнеспособность и активность ДК различных лечебных методов, в том числе химиотерапии, хирургических вмешательств и лучевой терапии [95].

Например, при применении в стандартных дозах химиопрепараты подавляют активность ДК, но в сверхнизких дозах (1/20 от максимально переносимой дозы) они способны стимулировать созревание и функциональную активность ДК [96, 97]. Кроме того, возрастные изменения жизнеспособности, активности и функций ДК могут влиять на противоопухолевый иммунный ответ при раке [98].

Известно о прямом влиянии различных факторов окружающей среды на ДК. Например, после ингаляции карбоновых наночастиц у мышей отмечаются системные изменения в функциях ДК [99]. При этом стоит отметить, что захваченные ДК наночастицы

способны по-разному влиять на антигенпрезентирующую функцию ДК. Например С (60)—фуллерены стимулируют опосредованный ГКГС I типа Т-клеточный ответ, а оксид графена, напротив, сокращал иммуностимуляторный потенциал ДК [100]. В отличие от С (60)—фуллеренов оксид графена снижает внутриклеточный уровень иммунопротеосомы LMP7, необходимой для обработки белковых антигенов.

Выводы

С учетом описанных выше индуцированных опухолю патологических изменений в ДК в опухолевом микроокружении можно выделить 4 типа ДК:

- 1-й тип — неповрежденные и функционально полноценные ДК, способные мигрировать в опухоль, обрабатывать и представлять антигены для дальнейшего иммунного ответа. Данный тип играет центральную роль в стимуляции опухоле-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов;
- 2-й тип — апоптотически измененные ДК;

- 3-й тип — функционально неполноценные ДК, неспособные к полноценной миграции, презентации антигенов и стимуляции цитотоксических лимфоцитов. Большую часть данной популяции составляют зрелые ДК, функции которых подавлены опухолевыми факторами;
- 4-й тип — регуляторные (толерогенные) ДК. Их особенностью является способность напрямую подавлять пролиферацию Т-клеток и индуцировать образование регуляторных Т-клеток.

У онкологических больных дисфункция ДК может привести к серьезным последствиям в виде дефицита противоопухолевого иммунитета, прогрессии опухоли и снижения ответа на иммунотерапию. Все это важно учесть для переосмысления стратегии иммунотерапии опухоли. Таким образом, подходы, направленные на усиление жизнеспособности ДК, профилактику их дисфункции и поляризации, следует рассматривать как необходимый этап работы по увеличению эффективности вакцин на основе ДК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sato K., Fujita S.. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 2007;56(3):183–91. DOI: 10.2332/allergolint.R-06-139. PMID: 17646733.
2. Wollenberg A., Mommaas M., Oppel T. et al. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002;118(2):327–34. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x. PMID: 11841552.
3. Guttman-Yassky E., Lowes M.A., Fuentes-Duculan J. et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(5):1210–7. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.03.006.
4. Segura E., Touzot M., Bohineust A. et al. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 2013;38(2):336–48. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.018.
5. Lutz M.B., Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23(9):445–9. DOI: S1471490602022810[pil]. PMID: 12200066.
6. Menges M., Rossner S., Voigtlander C. et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exper Med* 2002;195(1):15–21. PMID: 11781361.
7. Shurin G.V., Ma Y., Shurin M.R. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer microenviron* 2013;6(2):159–67. DOI: 10.1007/s12307-013-0133-3. PMID: 23749739; PMCID: PMC3717058.
8. Manavalan J.S., Rossi P.C., Vlad G. et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;11(3–4):245–58. DOI: 10.1016/s0966-3274(03)00058-3. PMID: 12967778.
9. Anderson A.E., Sayers B.L., Haniffa M.A. et al. Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2008;84(1):124–33. DOI: 10.1189/jlb.1107744. PMID: 18430785; PMCID: Pmc2504714.
10. Dai H., Zhu H., Lei P. et al. Programmed death-1 signaling is essential for the skin allograft protection by alternatively activated dendritic cell infusion in mice. *Transplantation* 2009;88(7):864–73. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181b6ea74. PMID: 19935456.
11. Papenfuss T.L., Powell N.D., McClain M.A. et al. Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. *J Immunol* 2011;186(6):3346–55. DOI: 10.4049/jimmunol.1001322. PMID: 21317386; PMCID: Pmc3600583.
12. Scott C.L., Aumeunier A.M., Mowat A.M. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 2011;32(9):412–9. DOI: 10.1016/j.it.2011.06.003. PMID: 21816673.
13. Ma Y., Shurin G.V., Gutkin D.W., Shurin M.R. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin cancer biol* 2012;22(4):298–306. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.02.010. PMID: 22414911; PMCID: PMC3373995.
14. Qian C., Cao X. Naturally occurring CD1c+ human regulatory dendritic cells: immunoregulators that are expanded in response to E. coli infection. *Eur J Immunol* 2012;42(6):1388–92. DOI: 10.1002/eji.201242632. PMID: 22678895.
15. Liu Q., Zhang C., Sun A. et al. Tumor-educated CD11bhighIalow regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol* 2009;182(10):6207–16. PMID: 19414774.
16. Shurin G.V., Ouellette C.E., Shurin M.R. Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(2):223–30. PMID: 22065047.
17. Shurin M.R. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43(3):158–64. PMID: 9001569.
18. Schuler G., Steinman R.M. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997;186(8):1183–7. PMID: 9379142.
19. Esche C., Shurin M.R., Lotze M.T. The use of dendritic cells for cancer vaccination.

- Curr Opin Mol Ther 1999;1(1):72–81. PMID: 11249687.
20. Mukherji B., Chakraborty N.G., Yamasaki S. et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. PNAS 1995;92(17): 8078–82. PMID: 7644541.
 21. Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F. et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. Nat Med 1996;2(1):52–8. PMID: 8564842.
 22. Murphy G., Tjoa B., Ragde H. et al. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. Prostate 1996;29(6):371–80. PMID: 8977634.
 23. Engleman E.G. Dendritic cells in the treatment of cancer. Biol Blood Marrow Transplant 1996;2(3):115–7. PMID: 9199753.
 24. Engleman E.G. Dendritic cells: potential role in cancer therapy. Cytotechnology 1997;25(1–3):1–8. PMID: 9474803.
 25. Zhong H., Han B., Tourkova I.L. et al. Low-dose paclitaxel prior to intratumoral dendritic cell vaccine modulates intratumoral cytokine network and lung cancer growth. Clin Cancer Res 2007; 13(18 Pt 1):5455–62. PMID: 17875775.
 26. Anguille S., Smits E.L., Lion E. et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. Lancet Oncol 2014;15(7):e257–67. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70585-0. PMID: 24872109.
 27. Ma Y., Shurin G.V., Peiyuan Z., Shurin M.R. Dendritic cells in the cancer microenvironment. Journal of Cancer 2013;4(1):36–44. DOI: 10.7150/jca.5046. PMID: 23386903; PMCID: Pmc3564245.
 28. Fridman W.-H., Dieu-Nosjean M.-C., Pagès F. et al. The Immune Micro-environment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. Cancer Microenvironment 2013;6(2):117–22. DOI: 10.1007/s12307-012-0124-9. PMID: PMC3717061.
 29. Stene M.A., Babajanian M., Bhuta S., Cochran A.J. Quantitative alterations in cutaneous Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. J Invest Dermatol 1988;91(2):125–8. PMID: 3260930.
 30. Alcalay J., Goldberg L.H., Wolf J.E.Jr., Kripke M.L. Variations in the number and morphology of Langerhans' cells in the epidermal component of squamous cell carcinomas. Arch Dermatol 1989;125(7):917–20. PMID: 2742388.
 31. Lissoni P., Vigore L., Ferranti R. et al. Circulating dendritic cells in early and advanced cancer patients: diminished percent in the metastatic disease. JBRHA 1999;13(4):216–9. PMID: 10703945.
 32. Ratta M., Fagnoni F., Curti A. et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. Blood 2002;100(1):230–7. PMID: 12070032.
 33. Tabarkiewicz J., Rybojad P., Jablonka A., Rolinski J. CD1c+ and CD303+ dendritic cells in peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer. Ocol Rep 2008;19(1):237–43. PMID: 18097601.
 34. Chevolet I., Speckaert R., Schreuer M. et al. Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. J Transl Med 2015;13:9. DOI: 10.1186/s12967-014-0376-x. PMID: 25592374; PMCID: Pmc4326397.
 35. Shurin M.R. Regulation of dendropoiesis in cancer. Clin Immunol Newsletter 1999;19(10/11):135–9.
 36. Shurin G.V., Shurin M.R., Bykovskaia S. et al. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. Cancer Res 2001;61(1):363–9. PMID: 11196188.
 37. Shurin G.V., Aalamian M., Pirtskhalaishvili G. et al. Human prostate cancer blocks the generation of dendritic cells from CD34+ hematopoietic progenitors. Eur Urol 2001;39(Suppl 4): 37–40. PMID: 11340288.
 38. Rughetti A., Pellicciotta I., Biffoni M. et al. Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. J Immunol 2005;174(12):7764–72. PMID: 15944279.
 39. Ogden A.T., Horgan D., Waziri A. et al. Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. Neurosurgery 2006;59(4):902–9; discussion 9–10. DOI: 10.1227/01.neu.0000233907.03070.7b. PMID: 17038955.
 40. Hasebe H., Nagayama H., Sato K. et al. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. Biomed Pharmacother 2000;54(6):291–8. DOI: 10.1016/s0753-3322(00)80050-5. PMID: 10989961.
 41. O'Toole A., Michielsen A.J., Nolan B. et al. Tumour microenvironment of both early- and late-stage colorectal cancer is equally immunosuppressive. Br J Cancer 2014;111(5):927–32. DOI: 10.1038/bjc.2014.367. PMID: 25058349.
 42. Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med 1996;2(10):1096–103. PMID: 8837607.
 43. Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucka A.K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. Nat Immunol 2000;1(6):510–4. DOI: 10.1038/82763. PMID: 11101873.
 44. Lin M.F., Mou H.B., Cen H. [Effects of transforming growth factor beta1 on dendritic cells function]. Zhonghua xue ye xue za zhi 2004;25(8):449–52. PMID: 15555257.
 45. O'Donnell R.K., Mick R., Feldman M. et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. Cancer Lett 2007;255(1):145–52. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.04.003. PMID: 17574329; PMCID: PMC2121220.
 46. Takagi S., Miyagawa S., Ichikawa E. et al. Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma. Hum Pathol 2004;35(7):881–6. PMID: 15257553.
 47. Furihata M., Ono Y., Ichikawa K. et al. Prognostic significance of CD83 positive, mature dendritic cells in the gallbladder carcinoma. Oncol Rep 2005;14(2):353–6. PMID: 16012714.
 48. Aso T., Ogawa Y., Naoe M. et al. Immunohistochemical analysis of CD83, CD8 and CD4 positive cells in renal cell carcinoma. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 2004;95(4):645–50. PMID: 15197997.
 49. Esche C., Lokshin A., Shurin G.V. et al. Tumor's other immune targets: dendritic cells. J Leukoc Biol 1999;66(2):336–44. PMID: 10449178.
 50. Katsenelson N.S., Shurin G.V., Bykovskaia S.N. et al. Human small cell lung carcinoma and carcinosarcoma regulate dendritic cell maturation and function. Mod Pathol 2001;14(1):40–5. PMID: 11211308.
 51. Kiertscher S.M., Luo J., Dubinett S.M., Roth M.D. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. J Immunol 2000;164(3):1269–76.
 52. Onishi H., Morisaki T., Baba E. et al. Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer. Clin Immunol 2002;105(3):286–95. PMID: 12498810.
 53. Onishi H., Morisaki T., Kuroki H. et al. Evaluation of a dysfunctional and short-lived subset of monocyte-derived dendritic cells from cancer patients. Anticancer Res 2005;25(5):3445–51. PMID: 16101162.
 54. Pinzon-Charry A., Maxwell T., McGuckin M.A. et al. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. Breast Cancer Res 2006;8(1):R5. PMID: 16417648.
 55. Esche C., Shurin G.V., Kirkwood J.M. et al. Tumor necrosis factor-alpha-promoted expression of Bcl-2 and inhibition of

- mitochondrial cytochrome c release mediate resistance of mature dendritic cells to melanoma-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001;7(3 Suppl):974s–9s.
56. Balkir L., Tourkova I.L., Makarenkova V.P. et al. Comparative analysis of dendritic cells transduced with different anti-apoptotic molecules: sensitivity to tumor-induced apoptosis. *J Gene Med* 2004;6(5):537–44. DOI: 10.1002/jgm.545. PMID: 15133764.
57. Esche C., Gambotto A., Satoh Y. et al. CD154 inhibits tumor-induced apoptosis in dendritic cells and tumor growth. *Eur J Immunol* 1999;29(7):2148–55. DOI: 10.1002/(sici)1521-4141(199907)29:07<#60;2148::aid-immu2148>3.0.co;2-f. PMID: 10427977.
58. Yang T., Witham T.F., Villa L. et al. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. *Cancer Res* 2002;62(9):2583–91. PMID: 11980653.
59. Peguet-Navarro J., Sportouch M., Popa I. et al. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003;170(7):3488–94. PMID: 12646609.
60. Ishida A., Ohta M., Toda M. et al. Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics* 2008;8(16):3342–9. DOI: 10.1002/pmic.200800039. PMID: 18690650.
61. Kusume A., Sasahira T., Luo Y. et al. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer. *Pathobiology* 2009;76(4):155–62. DOI: 10.1159/000218331. PMID: 19571604.
62. Alcalay J., Kripke M.L. Antigen-presenting activity of draining lymph node cells from mice painted with a contact allergen during ultraviolet carcinogenesis. *J Immunol* 1991;146(6):1717–21. PMID: 1672330.
63. Halliday G.M., Reeve V.E., Barnetson R.S. Langerhans cell migration into ultraviolet light-induced squamous skin tumors is unrelated to anti-tumor immunity. *J Invest Dermatol* 1991;97(5):830–4. PMID: 1680931.
64. Halliday G.M., Lucas A.D., Barnetson R.S. Control of Langerhans' cell density by a skin tumour-derived cytokine. *Immunology* 1992;77(1):13–8. PMID: 1398759.
65. Becker Y. Dendritic cell activity against primary tumors: an overview. *In Vivo* 1993;7(3):187–91. PMID: 8357960.
66. Tas M.P., Simons P.J., Balm F.J., Drexhage H.A. Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones. *Cancer Immunol Immunother* 1993;36(2):108–14.
67. Stoger H., Wilders-Truschniig M., Samonigg H. et al. The presence of immunosuppressive 'p15E-like' factors in the serum and urine of patients suffering from malign and benign breast tumours. *Clin Exp Immunol* 1993;93(3):437–41. PMID: 8370172.
68. Aalamian M., Pirtskhalaishvili G., Nunez A. et al. Human prostate cancer regulates generation and maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Prostate* 2001;46(1):68–75. PMID: 11170134.
69. Chaux P., Moutet M., Faivre J. et al. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 1996;74(5):975–83. PMID: 8642792.
70. Satthaporn S., Robins A., Vassanasiri W. et al. Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(6):510–8. PMID: 14740176.
71. Kichler-Lakomy C., Budinsky A.C., Wolfram R. et al. Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer. *Eur J Med Res* 2006;11(1):7–12. PMID: 16504954.
72. Gabrilovich D.I., Ciernik I.F., Carbone D.P. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol* 1996;170(1):101–10. PMID: 8665590.
73. Ni X.Y., Sui H.X., Liu Y. et al. TGF-beta of lung cancer microenvironment upregulates B7H1 and GITRL expression in dendritic cells and is associated with regulatory T cell generation. *Oncology reports* 2012;28(2):615–21. DOI: 10.3892/or.2012.1822. PMID: 22614805.
74. Krempski J., Karyampudi L., Behrens M.D. et al. Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J Immunol* 2011;186(12):6905–13. PMID: 21551365.
75. Nestle F.O., Burg G., Fah J. et al. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997;150(2):641–51. PMID: 9033277; PMCID: Pmc1858265.
76. Brown R.D., Pope B., Murray A. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 2001;98(10):2992–8. PMID: 11698282.
77. Enk A.H., Jonuleit H., Saloga J., Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997;73(3):309–16. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19971104)73:3<309::AID-IJC1>3.0.CO;2-3[pil]. PMID: 9359474.
78. Pedroza-Gonzalez A., Zhou G., Vargas-Mendez E. et al. Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology* 2015;4(6):e1008355. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1008355. PMID: 26155417; PMCID: Pmc4485712.
79. Ghirelli C., Reyat F., Jeanmougin M. et al. Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer Res* 2015;75(14):2775–87. DOI: 10.1158/0008-5472.can-14-2386. PMID: 25977333.
80. Asford C., Leccia M.T., Charles J., Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res* 2013;1(6):402–15. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-13-0114-t. PMID: 24778133.
81. Demoulin S., Herfs M., Delvenne P., Hubert P. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J Leukoc Biol* 2013;93(3):343–52. DOI: 10.1189/jlb.0812397. PMID: 23136258.
82. Gai X.D., Song Y., Li C. et al. Potential role of plasmacytoid dendritic cells for FOXP3+ regulatory T cell development in human colorectal cancer and tumor draining lymph node. *Pathol Res Pract* 2013;209(12):774–8. DOI: 10.1016/j.prp.2013.08.011. PMID: 24080284.
83. Conrad C., Gregorio J., Wang Y.H. et al. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res* 2012;72(20):5240–9. DOI: 10.1158/0008-5472.can-12-2271. PMID: 22850422; PMCID: Pmc3652570.
84. Huang X.M., Liu X.S., Lin X.K. et al. Role of plasmacytoid dendritic cells and inducible costimulator-positive regulatory T cells in the immunosuppression microenvironment of gastric cancer. *Cancer Science* 2014;105(2):150–8. DOI: 10.1111/cas.12327. PMID: 24261990; PMCID: Pmc4317822.
85. Sisirak V., Faget J., Vey N. et al. Plasmacytoid dendritic cells deficient in IFNalpha production promote

- the amplification of FOXP3+ regulatory T cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncoimmunology* 2013;2(1):e22338. DOI: 10.4161/onci.22338. PMID: 23482834; PMCID: Pmc3583914.
86. Ramos R.N., de Moraes C.J., Zelante B, Barbuto J.A. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clinical & developmental immunology* 2013;2013:806025. DOI: 10.1155/2013/806025. PMID: 23762097; PMCID: Pmc3674660.
87. Ghiringhelli F., Puig P.E., Roux S. et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202(7):919–29. DOI: jem.20050463 [pii]10.1084/jem.20050463. PMID: 16186184.
88. Aspod C., Pedroza-Gonzalez A., Gallegos M. et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 2007;204(5):1037–47. DOI: 10.1084/jem.20061120. PMID: 17438063; PMCID: PMC2118566.
89. Popov A., Abdullah Z., Wickenhauser C. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppressive granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of clinical investigation* 2006;116(12):3160–70. DOI: 10.1172/JCI28996. PMID: 17111046.
90. Saint-Mezard P., Chavagnac C., Bosset S. et al. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol* 2003;171(8):4073–80. PMID: 14530328.
91. Seiffert K., Granstein R.D. Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:195–206. DOI: 10.1196/annals.1366.011. PMID: 17192566.
92. Makarenkova V.P., Esche C., Kost N.V. et al. Identification of delta- and mu-type opioid receptors on human and murine dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2001;117(1–2):68–77. PMID: 11431006.
93. Piemonti L., Monti P., Allavena P. et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999;162(11):6473–81. PMID: 10352262.
94. Maestroni G.J. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. *J Immunol* 2000;165(12):6743–7. PMID: 11120793.
95. Bellik L., Gerlini G., Parenti A. et al. Role of conventional treatments on circulating and monocyte-derived dendritic cells in colorectal cancer. *Clin Immunol* 2006;121(1):74–80. PMID: 16914380.
96. Shurin M.R., Naiditch H., Gutkin D.W. et al. ChemolImmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* 2012;19(12):1792–803. PMID: 22414087.
97. Kaneno R., Shurin G.V., Kaneno F.M. et al. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;34(2):97–106. PMID: 21290210.
98. Shurin M.R., Shurin G.V., Chatta G.S. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64(2):90–105.
99. Tkach A.V., Shurin G.V., Shurin M.R. et al. Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure. *ACS nano* 2011;5(7):5755–62. PMID: 21657201.
100. Tkach A.V., Yanamala N., Stanley S. et al. Graphene oxide, but not fullerenes, targets immunoproteasomes and suppresses antigen presentation by dendritic cells. *Small* 2013;9(9–10):1686–90. DOI: 10.1002/sml.201201546. PMID: 22887961.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ β В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА И МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКОМ

Б.Е. Полоцкий, Б.Б. Ахмедов, Е.А. Богуш, Е.А. Дудко, Т.А. Богуш, М.М. Давыдов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Евгений Александрович Дудко labmedchem@mail.ru

Введение. Поиск патогенетически обоснованных подходов к лечению немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является несомненно одной из первоочередных задач, так как результаты лекарственного лечения этого заболевания нельзя признать удовлетворительными. Открытие нового класса ядерных рецепторов — эстрогеновых рецепторов β (ЭР β), которые экспрессируются в ткани НМРЛ, послужило серьезным основанием для развития новой стратегии лечения НМРЛ — антиэстрогеновой терапии.

Цель исследования — получение ответа на клинически значимый вопрос, какое число пациентов с НМРЛ и с метастазами в легком опухолей другой первичной локализации являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии.

Материалы и методы. Проведена сравнительная количественная оценка частоты и уровня экспрессии ЭР β в ткани НМРЛ и метастазов в легком (суммарно 74 образца) при использовании иммунофлуоресцентного метода и проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Экспрессия ЭР β выявлена в подавляющем числе образцов НМРЛ и метастазов в легком (92 и 86 % соответственно). Средний уровень экспрессии ЭР β в ткани НМРЛ статистически значимо выше по сравнению с метастазами (42,0 % против 34,6 %, $p = 0,03$). Первичные опухоли с высоким (≥ 50 %) уровнем экспрессии ЭР β и суммарно с низким и умеренным (< 50 %) уровнем выявлены в 35 и 65 % случаев, а метастазы с аналогичными показателями экспрессии маркера — у 14 и 86 % пациентов соответственно.

Заключение. Экспрессия в опухоли ЭР β прогнозирует более благоприятное течение болезни, одной из причин этого может быть больший метастатический потенциал опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии ЭР β . Около 70 % пациентов с НМРЛ и с метастатическим поражением органа являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии в адъювантном режиме.

Ключевые слова: BRCA1, рецепторы эстрогенов, рак молочной железы, проточная цитофлуориметрия, прогноз

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-34-36

EXPRESSION LEVEL OF ESTROGEN RECEPTOR β IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND LUNG METASTASIS

B.E. Polotsky, B.B. Akhmedov, E.A. Dudko, E.A. Bogush, T.A. Bogush, M.M. Davydov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. A search for pathogenetically grounded approaches to the treatment of non-small cell lung cancer is undoubtedly one of the top priorities, because of the results of its treatment cannot be regarded as satisfactory. Discovery of a new type of receptors, estrogen receptors β , that expressed in non-small cell lung cancer, created the preconditions for the development of a new treatment strategy for non-small cell lung cancer, namely antiestrogen therapy.

Objective was to answer to the clinically significant question of how many patients with non-small cell lung cancer and lung metastases are potential candidates for antiestrogen treatment.

Materials and methods. A comparative quantitative estimation of the level and frequency of the estrogen receptors β expression in non-small cell lung cancer tissues and also in lung metastases (74 in total) was carried out by flow cytometry.

Results. The estrogen receptors β expression was detected in the majority of the investigated tumors and lung metastases, in 92 and 86 % of patients, respectively. The average level of estrogen receptors β expression in non-small cell lung cancer tissue was higher than in metastases (42 % and 34.6 % respectively). The differences was statistically significant ($p = 0.03$). Primary tumors with a high and low+moderate estrogen receptors β expression levels were detected in 35 % and 65 % of cases respectively and metastases with such expression levels — in 14 % and 86 % of cases respectively.

Conclusion. 1. The estrogen receptors β expression in the tumor predicts a more favorable course of the disease. One of the reasons for this may be a greater metastatic potential of tumor cells with low estrogen receptors β expression. 2. The group of potential candidates for carrying out the adjuvant antiestrogen therapy comprises about 70 % of patients with primary lung tumors and with metastatic lesions of lung.

Key words: BRCA1, estrogen receptors, breast cancer, flow cytometry, prognosis

Введение

Поиск патогенетически обоснованных подходов к лечению немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является несомненно одной из первоочередных задач, так как результаты лекарственного лечения этого заболевания нельзя признать удовлетворительными. Поэтому открытие нового класса рецепторов — эстрогеновых рецепторов β (ЭР β), которые выявляются в солидных опухолях разных локализаций, служит серьезным основанием для развития новой стратегии лечения НМРЛ — антиэстрогеновой терапии.

По данным разных авторов, ЭР β выявляются в 60–80 % случаев НМРЛ [1–3]. Экспрессия маркера прогнозирует более благоприятное течение болезни [4, 5], а отсутствие ЭР β является независимым фактором, ухудшающим прогноз НМРЛ [6].

В настоящем исследовании проведена сравнительная количественная оценка частоты и уровня экспрессии ЭР β в ткани НМРЛ, а также метастазов в легком опухолей другой первичной локализации, чтобы ответить на клинически значимый вопрос, какое число пациентов с НМРЛ и с метастазами в легком опухолей другой первичной локализации являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии.

Материалы и методы

Исследование проведено количественным иммунофлуоресцентным методом, разработанным и запатентованным авторами [7], с использованием моноклональных антител к ЭР β (Abcam, 14C8), изотипических (Abcam, MG2a — 53) и вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC в конечном разведении 1:500 (Sigma, F2772).

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Количество специфически флуоресцирующих клеток (%), уровень экспрессии ЭР β определяли с помощью теста Колмогорова—Смирнова, включенного в программу FlowJo 7.6, статистическую обработку проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Различия между группами сравнения оценивали по t-критерию Стьюдента. Для контроля активности антител использовали культуру клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. Суммарно исследовано

74 образца опухолей, полученных во время хирургических операций в РОНЦ им. Н.Н. Блохина (37 — первичные опухоли, 37 — метастазы).

Результаты и обсуждение

Экспрессия ЭР β выявлена в подавляющем числе исследованных образцов НМРЛ и метастазов в легком — в 92 и 86 % случаев соответственно.

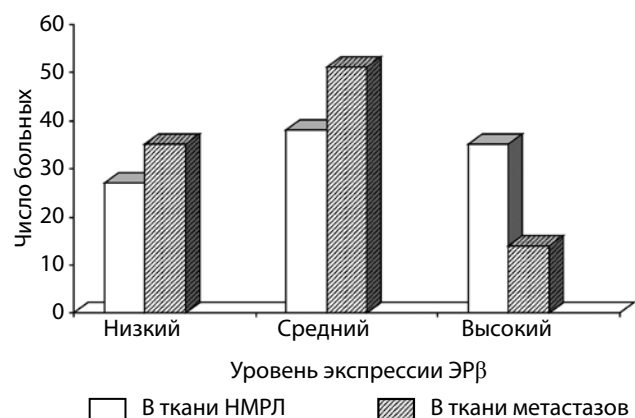
Результаты сравнительной оценки уровня экспрессии ЭР β в ткани первичной опухоли и метастазов в легком представлены в таблице. Видно, что средний уровень экспрессии ЭР β в ткани НМРЛ составил 42 %, а в метастазах оказался статистически значимо ниже — 34,6 % ($p = 0,03$).

На рисунке представлено распределение исследованных образцов опухолей в зависимости от уровня

Частота эстрогеновых рецепторов β в ткани немелкоклеточного рака легкого и метастазов в легком опухолей других первичных локализаций

Группы сравнения	Размер выборки	Уровень экспрессии ЭР β , %*	Достоверность различия между группами
НМРЛ	37	42,0 $\pm$ 15,3	$p = 0,03$
МТС	37	34,6 $\pm$ 12,1	

Примечание. НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; МТС — метастазы в легком; ЭР β — эстрогеновые рецепторы β .
*Количество специфически флуоресцирующих клеток $\pm$ стандартное отклонение.



Распределение больных в зависимости от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов β в клетках немелкоклеточного рака легкого и метастазов в легком опухолей других первичных локализаций. НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ЭР β — эстрогеновые рецепторы β

экспрессии ЭРβ в опухолевой ткани: низкий уровень — ЭРβ выявлены менее чем в 30 % клеток, умеренный — в 30–49 %, высокий — в 50 % и более.

Видны значительные различия в числе больных с высоким уровнем экспрессии ЭРβ в ткани НМРЛ и метастазов — 35 % против 14 % случаев соответственно ($p = 0,03$). Суммарное число опухолей с низким и умеренным уровнем экспрессии ЭРβ у больных НМРЛ составило 65 %, а у пациентов с метастазом в легком было статистически значимо выше — 86 % случаев ($p = 0,03$).

Чем вызвано выявленное снижение уровня и частоты экспрессии ЭРβ в метастазах по сравнению с первичной опухолью? Если опустить возможный вклад гистологической разнородности метастазов, наиболее вероятной причиной этого может быть больший метастатический потенциал опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии ЭРβ, что согласуется с данными ряда авторов о прогностически

благоприятной значимости экспрессии в опухоли ЭРβ [4–6].

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании продемонстрирован клинически важный факт. Показано, что значительное число пациентов с НМРЛ и с метастазами в легком опухолей другой первичной локализации являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии. По аналогии с раком молочной железы речь может идти об адъювантном применении антиэстрогенов у радикально оперированных больных с первичным или метастатическим поражением легкого с положительным статусом ЭРβ в опухоли, и в первую очередь — с высоким уровнем экспрессии рецепторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№№ 15-04-06991-а, 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента РФ МК-7709.2016.7.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Raso M.G., Behrens C., Herynk M.H. et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. Clin Cancer Res 2009;15(17):5359–68. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0033. PMID: 19706809.
2. Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е., Жураев Э.Э. и др. Особенности клинического течения и прогноза периферического рака легкого у женщин. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2011;22(3):47–54.
3. Шатурова А.С., Богущ Т.А., Дудко Е.А. и др. Экспрессия эстрогеновых рецепторов β и β1 в ткани немелкоклеточного рака легкого человека. Антибиотики и химиотерапия 2012;57(5–6):11–7.
4. Wu C.T., Chang Y.L., Shih J.Y., Lee Y.C. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;130 (4):979–86. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.06.012. PMID: 16214508.
5. Kawai H., Ishii A., Washiya K. et al. Combined overexpression of EGFR and estrogen receptor alpha correlates with a poor outcome in lung cancer. Anticancer Res 2005;25 (6C): 4693–4698. PMID: 16334162.
6. Kawai H., Ishii A., Washiya K. et al. Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2005;11(14):5084–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0200. PMID: 16033821.
7. Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. Вестник Московского университета, сер. 2, Химия 2011;52(4):305–12.

ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Ш.Г. Хакимова, А.А. Борунова, Д.В. Табаков,
И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва,
Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина tatzabotina@yandex.ru

Цель исследования — изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови первичных больных раком молочной железы.

Материалы и методы. С помощью многопараметрового проточно-цитометрического анализа исследовали периферическую кровь 70 первичных больных раком молочной железы и 39 здоровых женщин. Использовали моноклональные антитела к антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD45.

Результаты. Статистически достоверное нарушение линейной структуры лимфоцитов — Т-клеток с фенотипом $CD45^{+}/CD3^{+}/CD19^{-}$, В-лимфоцитов с фенотипом $CD45^{+}/CD3^{-}/CD19^{+}$ и NK-лимфоцитов с фенотипом $CD45^{+}/CD3^{-}/CD16^{+}56^{+}$ — выявляется только при анализе индивидуальных иммунограмм, но не при анализе всей группы больных раком молочной железы.

Заключение. На основе анализа частоты встречаемости нарушений среди больных раком молочной железы с низкими показателями соотношения CD4/CD8 определены 4 различных варианта нарушений.

Ключевые слова: иммунологический фенотип лимфоцитов, проточная цитометрия, рак молочной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-37-39

IMMUNOLOGICAL PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH PRIMARY OPERABLE BREAST CANCER

T.N. Zabotina, O.V. Korotkova, Sh.G. Hakimova, A.A. Borunova, D.V. Tabakov, I.K. Vorotnikov, Z.G. Kadagidze

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Objective. The investigation is devoted to study subpopulation structure of lymphocytes from peripheral blood of patients, suffering from breast cancer.

Materials and methods. Peripheral blood of 70 patients with breast cancer and 39 healthy women was analyzed using the flow cytometry method with monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD45 antigens.

Results. Statistically significant disturbance of linear structure of lymphocytes (T-cells $CD45^{+}/CD3^{+}/CD19^{-}$; B-cells $CD45^{+}/CD3^{-}/CD19^{+}$; NK-cells $CD45^{+}/CD3^{-}/CD16^{+}56^{+}$) detected only in the analysis of individual immunograms, but not in analysis of whole group of breast cancer patients.

Conclusion. Based on analysis of frequency of occurrence of disturbances of cancer breast patients with low values of ratio CD4/CD8, it was detected 4 different variants of disturbance.

Key words: Immunological phenotype of lymphocytes, flow cytometry, breast cancer

Введение

В связи с активным внедрением в клиническую практику иммунологических подходов при лечении онкологических больных актуальным является поиск иммунологических нарушений в структуре иммунокомпетентных клеток, включая линейную структуру лимфоцитов и их Т-клеточного звена [1, 2].

Материалы и методы

Изучалась субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови 70 первичных больных раком молочной железы (РМЖ) до проведения хирургического этапа лечения. В качестве контрольной группы исследовали 39 образцов периферической крови здоровых женщин аналогичного возраста.

Для многопараметрового проточно-цитометрического анализа поверхностных антигенов использовали коммерческие моноклональные антитела (Beckman Coulter, BD Biosciences), конъюгированные FITC, PE, PE-Cy5, APC к антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD45.

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе проведено изучение линейной структуры клеточного звена иммунитета 70 первичных больных РМЖ в сравнении с 39 здоровыми лицами. Как известно, основным пулом лимфоцитов являются Т-клетки с фенотипом $CD45^+CD3^+CD19^-$, в норме на их долю приходится в среднем 75 %. В целом по группе различий в уровне содержания зрелых Т-лимфоцитов в периферической крови больных РМЖ и здоровых лиц не выявлено: $72,3 \pm 3,4$ и $75,0 \pm 0,6$ % соответственно. Однако диапазон значений при этом сильно варьировал – от 22,1 до 92,0 %, что послужило основанием для детального анализа данного показателя. Оказалось, что с низким содержанием $CD45^+CD3^+CD19^-$ Т-клеток в исследуемой группе больных было 17 (24,3 %) из 70 пациенток, уровень антигенположительных клеток в этой подгруппе составил $46,5 \pm 1,1$ %. С высокими показателями $CD45^+CD3^+CD19^-$ Т-клеток выявлено 13 (18,6 %) из 70 больных РМЖ, при этом средний уровень антигенположительных клеток в этой подгруппе составил $84,7 \pm 1,4$ %.

Второй значимой по количеству линейной популяцией лимфоцитов являются НК-клетки с фенотипом $CD45^+/CD3^-/CD16^+56^+$. В норме на их долю приходится не более 25 % среди всех лимфоидных клеток. Нами не выявлено различий в содержании линейной популяции НК-лимфоцитов в периферической крови больных РМЖ в целом по группе и у здоровых лиц: $16,8 \pm 1,2$ и $16,0 \pm 0,9$ % соответственно. Следует заметить, что диапазон значений также сильно варьировал и составил от 3,3 до 61,2 %. Высокие значения содержания НК-лимфоцитов выявлены у 17 (24,3 %) из 70 больных РМЖ, а уровень антигенположительных клеток в этой подгруппе составил $33,5 \pm 2,1$ %, что более чем в 2 раза превышает показатели донорской группы. Низкие показатели уровня НК-лимфоцитов периферической крови отмечены у 14 (20 %) из 70 пациенток с РМЖ, при этом уровень антигенположительных клеток в этой подгруппе составил лишь $6,5 \pm 0,1$ %.

Третьей линейной популяцией в составе лимфоцитов являются В-клетки, на долю которых в норме приходится не более 5–9 %. В целом по группе нарушений в составе $CD45^+CD3^-CD19^+$ В-линейного звена клеточного иммунитета нами не обнаружено. Медиана показателей у больных РМЖ практически не отличалась от группы сравнения: $5,7 \pm 0,8$ и $5,1 \pm 0,1$ %

соответственно. Однако у 3 (4,3 %) из 70 пациенток количество В-лимфоцитов оказалось значительно выше нормы и составило 41,4; 28,0 и 13,0 % антигенположительных клеток, среднее значение – 27,5 %. Полученные данные согласуются с результатами, полученными ранее [3]. При персонифицированном сопоставлении иммунограмм больных РМЖ с высокими и низкими показателями содержания линейных популяций лимфоцитов в периферической крови оказалось, что 13 (76,5 %) из 17 пациенток, имеющих низкие показатели $CD45^+CD3^+CD19^-$ Т-клеток, вошли в группу больных с высоким содержанием $CD45^+/CD3^-/CD16^+56^+$ НК-лимфоцитов. Напротив, среди 13 больных РМЖ с высоким содержанием $CD45^+CD3^+CD19^-$ Т-лимфоцитов у 10 (76,9 %) пациенток зафиксированы низкие показатели количества $CD45^+/CD3^-/CD16^+56^+$ НК-клеток. Также следует отметить, что все 3 пациентки из группы с высокими показателями уровня $CD45^+CD3^-CD19^+$ В-лимфоцитов имели сниженные показатели $CD45^+CD3^+CD19^-$ Т-лимфоцитов, при этом у 2 из них отмечено также низкое содержание $CD45^+/CD3^-/CD16^+56^+$ НК-клеток.

Важнейшим показателем состояния клеточного звена иммунной системы является анализ соотношения субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в структуре Т-клеток. В исследуемой группе больных медиана данного показателя оказалась равна 1,0, что свидетельствует либо о низких показателях уровня $CD4^+$, либо, напротив, о повышенных значениях $CD8^+$ лимфоцитов.

Анализ частоты встречаемости нарушений соотношения $CD4/CD8$ выявил, что 37 (52,8 %) пациенток имеют показатели ниже среднего значения по группе – $0,69 \pm 0,1$, что свидетельствует о грубых нарушениях в структуре Т-клеточного звена иммунитета. У 6 (8,5 %) больных данный показатель оказался выше значений по группе – $3,3 \pm 0,1$, и лишь 27 (38,5 %) первичных больных РМЖ имели показатели соотношения $CD4/CD8$, соответствующие нормальным значениям.

Нами были определены 4 различных варианта нарушений соотношения $CD4/CD8$ среди больных с низким показателем, менее 1,0:

1-й вариант: норма $CD4$ vs $\uparrow CD8$ – 7 (18,9 %) больных;

2-й вариант: $\downarrow CD4$ vs норма $CD8$ – 13 (35,1 %) больных;

3-й вариант: $\downarrow CD4$ vs $\uparrow CD8$ – 15 (40,6 %) больных;

4-й вариант: $\downarrow CD4$ vs $\downarrow CD8$ – 2 (5,4 %) больных.

Следует заметить, что среди различных вариантов нарушений соотношения $CD4/CD8$ ни в одном случае не были зафиксированы высокие показатели уровня $CD4$ лимфоцитов, только норма или низкие значения. Однако популяция $CD8$ клеток у 22 (59,0 %) из 37 больных превышала нормальные значения, у 13

(35,1 %) больных соответствовала норме, и лишь у 2 (5,4 %) были выявлены низкие параметры.

Заключение

Таким образом, изучение структуры основных линейных популяций лимфоцитов (Т, В, NK) периферической крови в целом по группе из 70 первичных

больных РМЖ не показало статистически значимых различий по сравнению с группой доноров. Только индивидуальный анализ показателей клеточного звена иммунитета, основанный на содержании уровня Т-клеток, позволил выявить различные варианты линейных структурных иммунологических нарушений лимфоидных клеток первично-операбельных больных РМЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Hadden J.W. The immunology and immunotherapy of breast cancer: An update. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:79–101. PMID:10230872.
2. Yi Huang, Chunling Ma, Qunyu Zhang et al. CD4⁺

and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* 2015;6(19):17462–78. DOI: 10.18632/oncotarget.3958. PMID: 25968569.

3. Короткова О.В., Заботина Т.Н., Скотаренко Л.В. и др. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(3):95–8.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ДЕНДРИМЕРЫ

Ю.В. Стукалов, Е.Ю. Григорьева, Н.С. Калыгина, Е.Ю. Колдаева, А.С. Масько

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Юрьевна Григорьева grig-elen11@mail.ru

Цель работы — синтез окислительно-восстановительного дендримера (REDOX-дендримера), ядром которого является тетраглицидиловый эфир пентаэритрита, а дендроном — производные антрахинона.

Материалы и методы. Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на жидкостном хроматографе SP 8000 (Spectra-Physics, США). Хроматограммы регистрировали с помощью УФ-детектора (Spectra-Physics, США) и рефрактометрического детектора (Jobin-Ivon, Франция). Структуру подтверждали методом протонного магнитного резонанса (ПМР) (Bruker WH-360, ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц. Контроль за ходом реакций вели с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Результаты. Синтезированы и выделены с помощью препаративной ВЭЖХ производные 2-метилантрахинона, их структура установлена ПМР-спектроскопией. Они использованы в качестве дендрона при синтезе дендримера. Изучена острая токсичность дендримера на мышах-самцах BDF1. Синтезированы REDOX-дендримеры, содержащие в своей структуре производные метилантрахинона. Показана низкая токсичность REDOX-дендримера.

Заключение. Схожесть структуры REDOX-дендримера с доксорубицином и его низкая токсичность дают предпосылки к дальнейшему изучению его противоопухолевой активности.

Ключевые слова: REDOX-дендример, производные 2-метилантрахинона, тетраглицидиловый эфир пентаэритрита, высокоэффективная жидкостная хроматография, токсикология

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-40-43

REDOX DENDRIMERS

Yu. V. Stukalov, E. Yu. Grigorieva, N. S. Kalygina, E. Yu. Koldaeva, A. S. Masko

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Aim of this work was the synthesis of REDOX-dendrimer core, which is tetraglycidyl ether of pentaerythritol, and a dendron, which is a derivative of anthraquinone.

Materials and methods. Analytical and preparative chromatography was carried out on a liquid chromatograph SP 8000 (Spectra-Physics (USA)). Chromatograms were recorded using a UV-detector (Spectra-Physics (USA)) and refractive index detector (Jobin-Ivon (France)). The structure was confirmed by PMR (Bruker WH-360 (Germany)) with an operating frequency of 360 MHz. Monitoring of reactions conducted using HPLC.

Results. Derivatives of 2-methylantraquinone were synthesized and isolated by use of preparative HPLC. Their structure was determined by PMR-spectroscopy. They were used as a dendron in the synthesis of dendrimer. Its toxicity was studied in male mice BDF1. Redox dendrimers containing methylantraquinone derivatives in its structure were synthesized. Low toxicity of obtained REDOX-dendrimer was shown.

Conclusion. The similarity of REDOX-dendrimer structure with doxorubicin and its low toxicity provides background for further study of its antitumor activity.

Key words: REDOX-dendrimer, derivatives 2-methylantraquinone, tetraglycidyl ether of pentaerythritol, HPLC, toxicology

Введение

В последнее время особое внимание вызывает разработка противоопухолевых препаратов для таргетной терапии онкологических заболеваний в виде наноконструкций на основе дендримеров [1]. Искусственные молекулы — кластеры маленьких молекул, связанные с центральным ядром, — называемые дендримерами, могут повысить точность доставки терапевтического

агента. Размер дендримеров мал (порядка 5 нм), поэтому они могут легко проникать в опухолевые клетки. Фармпрепараты на их основе могут стать универсальной системой доставки терапевтических агентов при таргетной терапии. Исследования конструкций на основе дендримеров, где терапевтическим агентом являлся радионуклид рений-188, показали их высокую эффективность *in vitro* и *in vivo* [2, 3].

Характеристика соединений

Соединение	Брутто-формула	С		Н	
		найдено, %	вычислено, %	найдено, %	вычислено, %
III	$C_{15}H_{10}O_3$	75,53	75,62	4,26	4,23
IV	$C_{15}H_{10}O_3$	75,64	75,62	4,17	4,23
VI	$C_{17}H_{28}O_8$	56,57	56,66	7,78	7,83
VII	$C_{77}H_{68}O_{20}$	70,45	70,42	5,18	5,22

Настоящая работа посвящена синтезу окислительно-восстановительных дендримеров (REDOX-дендример), ядром которых является тетраглицидиловый эфир пентаэритрита (ТГЭПЕ), а дендронами выступали производные антрахинона. Интерес к ним обусловлен тем, что производные 2-алкилантрахинона способны генерировать синглетный кислород и перекись водорода [4, 5]. Поскольку они близки к митоксантрон и доксорубину, возможно появление и других противоопухолевых эффектов.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы квалификации «чда» и «хч», бидистиллированную воду, а также программное обеспечение MarvinSketch фирмы ChemAxon's (свободная лицензия).

Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе SP 8000 (Spectra-Physics, США). Хроматограммы регистрировали с помощью УФ-детектора (Spectra-Physics, США) и рефрактометрического детектора (JobinYvon, Франция). Колонка для флэш-хроматографии размером 165 × 25 мм (силикагель, 40–60 мкм, Acros Organics, Бельгия). Подвижная фаза – гексан-ацетон (60: 40), скорость потока – 20 мл/мин, нагрузка – 1 г.

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали предколонку размером 30 × 2,1 мм (сорбент Pellicular ODS, 37–53 мкм, Whatman Inc., США), колонку размером 150 × 4,1 мм (сорбент Separon C8, 7 мкм). Подвижная фаза – ацетонитрил – вода (32,5: 67,5), скорость потока – 1 мл/мин. Препаративную ВЭЖХ осуществляли с использованием предколонки размером 30 × 2,1 мм (сорбент Pellicular ODS, 37–53 мкм, Whatman Inc., США), колонки размером 250 × 10 мм (сорбент Separon C8, 7 мкм). Подвижная фаза – ацетонитрил – вода (32,5: 67,5), скорость потока – 4 мл/мин. Структуру подтверждали методом протонного магнитного резонанса (ПМР) (Bruker WH-360, ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц в дейтерированном хлороформе, внутренним стандартом служил тетраметилсилан. Контроль за ходом реакций вели с помощью ВЭЖХ. Данные элементного анализа удовлетворяют вычисленным значениям (см. таблицу).

Синтез. III и IV. Колбу, содержащую фенол (1 г, 6,2 ммоль), графит (0,59 г, 49,3 ммоль), 4-метилфталевый ангидрид (0,58 г, 6,2 ммоль) и метансульфокислоту (7,5 мл), нагревали на водяной бане в течение 5 ч. Продукт экстрагировали хлороформом, промывали насыщенным NaCl, сушили Na_2SO_4 . Общий выход – 1,35 г (92 %). Выход III (препаративная ВЭЖХ) – 0,4 г.

VI. В колбу помещали пентаэритрит (1 г, 7,3 ммоль), диметилсульфоксид (9 мл) и гидроксид калия (1,65 г, 29,4 ммоль) и прикапывали эпихлоргидрин (3,5 мл, 44,1 ммоль). Массу перемешивали при 35 °С в течение 6 ч и оставляли на ночь. Реакционную массу экстрагировали этилацетатом. Выход (после флэш-хроматографии) – 1,85 г (70 %). Степень чистоты – 97 % (ВЭЖХ). 1H ПМР-спектр: 2.593 (дд, J = 6.5 Hz, 4H), 2.773 (т, J = 6.5 Hz) 2.922 (м, 4H), 3.10 (м, 4H), 3.37 (ддд, J = 7.0, 3.7, 1.5 Hz, 4H), 3.475 (д, J = 12 Hz, 4H) 3.515 (д, J = 12 Hz, 4H), 3.70 (дд, J = 12 and 7.0 Hz, 4H).

VII. Во флакон помещали ТГЭПЭ (85 мг, 0,24 ммоль), III (225 мг, 0,94 ммоль) и перемешивали в течение 90 мин на кипящей водяной бане. Выход – 300 мг (97 %).

Результаты и обсуждение

Для синтеза REDOX-дендримера, содержащего производные 2-метилантрахинона, получали дендроны по схеме, представленной на рис. 1. Дендроны получали конденсацией фенола с 4-метилфталевым ангидридом в метансульфокислоте в присутствии графита в соответствии с работой [6]. На рис. 2 приведена ВЭЖХ-хроматограмма полученного дендрона. По данным ПМР-спектров, пику 7 соответствует соединение III, пику 8 – IV.

REDOX-дендример синтезировали по схеме, представленной на рис. 3. Ядро REDOX-дендримера получали конденсацией пентаэритрита (I) с эпихлоргидрином по модифицированной нами методике в соответствии с работой [7]. Полученный ТГЭПЭ (II) далее конденсировали с дендроном – соединением III, получая целевой продукт.

В ходе токсикологических испытаний на мышам-самцах BDF1 были выявлены основные параметры

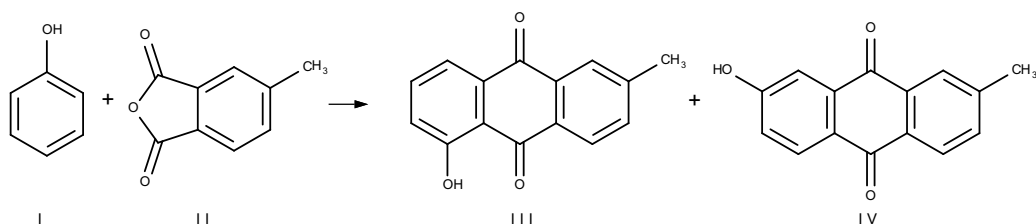


Рис. 1. Схема синтеза дендрона: I – фенол, II – 4-метилфталевый ангидрид, III – 1-гидрокси-6-метил-9,10-дигидроантрацен-9,10-дион, IV – 2-гидрокси-7-метил-9,10-дигидроантрацен-9,10-дион

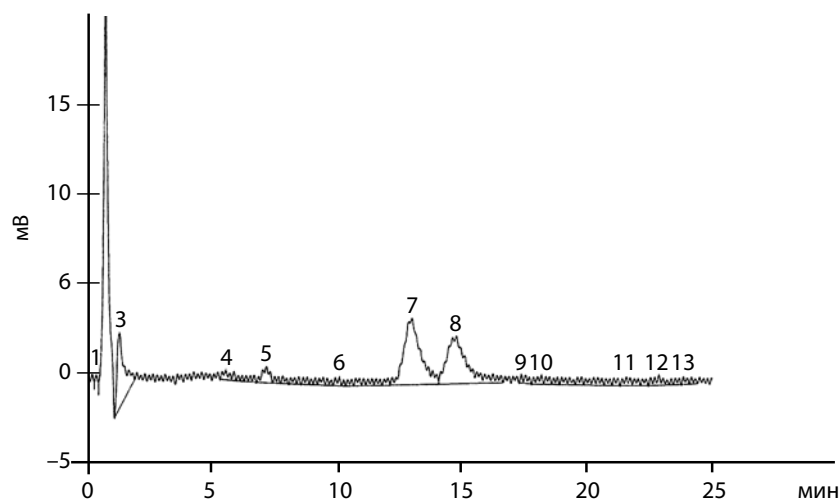


Рис. 2. Хроматограмма реакционной смеси в синтезе дендрона

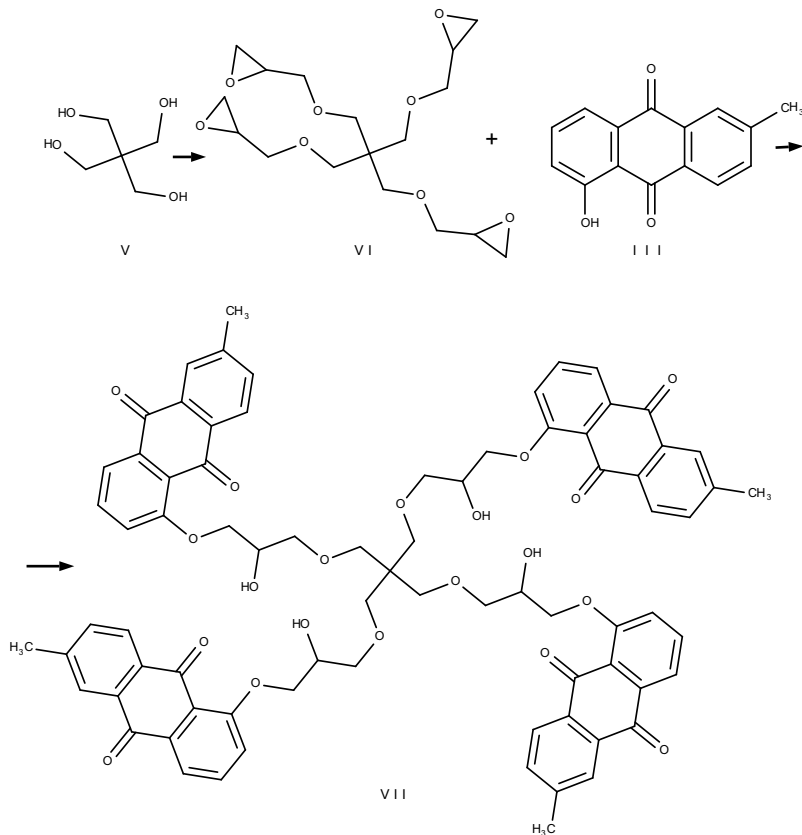


Рис. 3. Схема синтеза дендримера: V – пентаэритрит, VI – тетраглицидиловый эфир пентаэритрита, VII – окислительно-восстановительный дендример

токсикометрии REDOX-дендримера: максимально переносимая доза, равная 850 мг/кг; абсолютно смертельная доза, равная 1500 мг/кг; среднесмертельная доза, равная 1087,5 мг/кг. Порог острого действия соединения Lim_{ac} совпадал с максимально переносимой дозой [8, 9]. Рассчитанное значение зоны острого токсического действия составило 1,28, что характеризует вещество как безопасное.

Выводы

Синтезированы окислительно-восстановительные дендримеры (REDOX-дендримеры), содержащие в своей структуре производные метилантрахинона. Показана низкая токсичность REDOX-дендримера. Схожесть структуры REDOX-дендримера с доксорубицином и его низкая токсичность дают предпосылки к дальнейшему изучению его противоопухолевой активности.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Tekade R.K., Kumar P.V., Jain N.K. et al. Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon. *Chem Rev* 2009;109(1):49–87. DOI: 10.1021/cr068212n.
2. Стукалов Ю.В., Масько А.С., Калыгина Н.С. и др. Дендримеры как основа наноконструкций для таргетной радиотерапии в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал* 2010;9(3):24.
3. Колдаева Е.Ю., Григорьева Е.Ю., Стукалов Ю.В. и др. Сравнительная токсикология наноконструкций на основе дендримеров для таргетной радиотерапии в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал* 2010;9(3):14.
4. Hua D.H., Lou K., Havens J. et al. Synthesis and in vitro antitumor activity of substituted anthracene-1,4-diones. *Tetrahedron* 2004;60(45):10155–10163. DOI: 10.1016/j.tet.2004.09.026.
5. Campos-Martin J.M., Blanco-Brieva G., Fierro J.L. G. Hydrogen Peroxide Synthesis: An Outlook beyond the Anthraquinone Process. *Angewandte Chemie International Edition* 2006;45(42):6962–84. DOI: 10.1002/anie.200503779.
6. Sarvari M.H., Sharghi H. Simple and Improved Procedure for the Regioselective Acylation of Aromatic Ethers with Carboxylic Acids on the Surface of Graphite in the Presence of Methanesulfonic Acid. *Synthesis* 2004;13:2165–8. DOI: 10.1055/s-2004–831162.
7. Kida T., Yokota M., Masuyama A. et al. A Facile Synthesis of Polyglycidyl Ethers from Polyols and Epichlorohydrin. *Synthesis* 1993;5:487–489. DOI: 10.1055/s-1993–25890.
8. Колдаева Е.Ю., Стукалов Ю.В., Григорьева Е.Ю., Масько А.С. Острая токсичность REDOX-дендримеров. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):26.
9. Стукалов Ю.В., Колдаева Е.Ю., Кадырова Е.Л., Григорьева Е.Ю. Токсикология окислительно-восстановительных наноконструкций противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(4):111–2.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОЛИГОСАХАРИДОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

А.С. Гриневич, М.Н. Краева, О.С. Бурова, П.К. Иванов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Станиславович Гриневич agrinevich@mail.ru

Введение. Моноклональные антитела (МКАТ) служат надежным и удобным инструментом диагностики патологий человека. Чаще всего они используются в качестве конъюгатов с флуоресцентными и иными метками. Классический подход создания таких конъюгатов сводится к химическим реакциям с использованием белковой основы моноклональных антител. Вместе с тем для целого ряда МКАТ изготовление конъюгата сопровождается встраиванием метки в антигенсвязывающий участок, что приводит к уменьшению или полной потере специфической активности конъюгата. Выходом из данной ситуации может стать синтез флуоресцентных конъюгатов методами углеводной химии через пространственно удаленные от активного центра олигосахариды антител.

Цель исследования — показать принципиальную возможность химической модификации олигосахаридов МКАТ серии ICO и получить на их базе флуоресцентные конъюгаты.

Материалы и методы. В работе использовалась панель МКАТ серии ICO высокой степени очистки. Олигосахариды МКАТ, окисляясь до альдегидных групп, подвергались взаимодействию с гидразиновым производным биотина и конъюгировались со стрептавидин-флуоресцеином. Полученный комплекс был использован для прямой реакции иммунофлуоресценции.

Результаты. Все модифицированные МКАТ сохраняли специфичность связывания с клетками-мишенями, присущую нативным антителам.

Заключение. Данный метод может быть альтернативой для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, для которых методы белкового синтеза приводят к потере активности конъюгата.

Ключевые слова: моноклональные антитела, флуоресцентные конъюгаты, олигосахарид IgG, проточная цитометрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-44-48

THE USE OF OLIGOSACCHARIDES OF IMMUNOGLOBULIN FOR MODIFICATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, O.S. Burova, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Monoclonal antibodies are reliable and convenient tool for the diagnosis of human pathologies. Most often they are used as conjugates with fluorescent or other labels. The classical approach of creating such conjugates reduces chemical reactions using monoclonal antibodies protein base. However, for a number of manufacturing monoclonal antibodies conjugate followed by embedding tags in the antigen binding site, which leads to reduction or complete loss of specific activity of the conjugate. The way out of this situation could be the synthesis of fluorescent conjugates, methods of carbohydrate chemistry through spatially distant from the active site of the antibody oligosaccharides.

The purpose of the study — to show the fundamental possibility of chemical modification of the oligosaccharides monoclonal antibodies ICO series and get to their base fluorescent conjugates.

Materials and methods. We used monoclonal antibodies panel ICO series of high purity. Oligosaccharides monoclonal antibodies oxidized to aldehyde groups, is reacted with a hydrazine derivative of biotin and streptavidin-conjugated fluoristsinom. The resulting complex was used for the direct reaction immunofluorescence.

Results. All modified monoclonal antibodies retain binding specificity to target cells inherent to native antibodies.

Conclusions. This may be an alternative method for conjugating a fluorescent label with monoclonal antibodies to protein synthesis methods which lead to loss of activity of the conjugate.

Key words: monoclonal antibody, fluorescent conjugates, oligosaccharide IgG, flow cytometry

Введение

Иммуноглобулины по химической природе являются гликопротеидами. Классический подход к модификации моноклональных антител (МКАТ) для их использования в иммунометрическом анализе сводится к химическим реакциям, затрагивающим белковую часть молекулы IgG. Наличие достаточно большого количества стерически доступных аминокислотных групп на «поверхности» IgG позволяет вводить в структуру этой молекулы флуоресцентные и иные маркеры, связывать IgG с хроматографическими сорбентами и т. д. Однако наш опыт показывает, что для некоторых МКАТ возможно получение конъюгата с потерей специфической активности, что вероятно связано с блокированием активного центра. Вместе с тем олигосахаридные детерминанты МКАТ расположены в области CH_2 домена и связаны с аспарагином 297, находясь вне антигенсвязывающего центра антител. Показана принципиальная возможность использования олигосахаридов для модификаций поликлональных антител [1–3].

В течение нескольких лет в РОНЦ им. Н.Н. Блохина под руководством профессора А.Ю. Барышникова была создана коллекция гибридом-продуцентов МКАТ серии ICO, сейчас они активно используются для диагностики онкологических и других заболеваний.

Цель настоящего исследования — показать принципиальную возможность химической модификации олигосахаридов МКАТ серии ICO и получить на их базе флуоресцентные конъюгаты.

Материалы и методы

Получение и фракционирование МКАТ. В работе использованы клоны ICO 31 (анти-CD8), ICO 86 (анти-CD4), ICO 90 (анти-CD3), ICO 150 (анти-CD24), ICO 160 (анти-CD95) и ICO 180 (анти-CD20). Источником МКАТ служили асцитные жидкости мышей линии BALB/c. Фракционирование МКАТ проводили с использованием аффинной хроматографии на белке А [4], сульфата аммония, анионообменника MonoQ и гель-фильтрации на Superdex 200 [5], а также каприловой кислоты (КК) [6]. Чистоту полученных МКАТ анализировали SDS-ПААГ электрофорезом по Лэммли [7].

Периодатное окисление углеводов МКАТ. МКАТ переводили в 0,9 % раствор хлорида натрия, pH 6,5 (ФР). Здесь и далее для смены буфера использовали обессоливающие колонки PD-10, для концентрирования образцов — центрифужный фильтр Centricon. Готовили свежий 100 мМ раствор натрия периодата (NaIO_4) на деионизированной воде. К образцам МКАТ добавляли NaIO_4 до конечной концентрации 1–10 мМ и выдерживали в темноте при температуре 25 °С при постоянном перемешивании в течение

30 мин. К реакционной смеси добавляли 50 мкл этиленгликоля и продолжали инкубировать еще 15 мин. По завершении реакции МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов.

Взаимодействие окисленных МКАТ с модифицирующими агентами. Сразу после окисления МКАТ инкубировали гидразинактивированное производное биотина (Biotin-LC-Hydrazide) в темноте при 25 или 37 °С при постоянном перемешивании в течение 2–24 ч. Далее МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов. Часть МКАТ после реакции с Biotin-LC-Hydrazide инкубировали со стрептавидин-флуоресцеином (STREPT-FITC) в темноте при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 18–24 ч для получения комплекса МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин. Степень включения флуоресцеина в IgG определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение конечного продукта при 2 длинах волн — 280 и 495 нм. Расчеты проводили по формулам:

$$\frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4} = [\text{IgG}],$$

где A_{280} — оптическая плотность раствора при 280 нм; A_{495} — оптическая плотность раствора при 495 нм.

$$\frac{2,87 \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})} = \text{ФЛ/ IgG},$$

где [IgG] — концентрация МКАТ мг/мл; ФЛ/IgG — молярное отношение FITC в МКАТ.

Реакцию прямой и непрямой иммунофлуоресценции (РИФ) ставили с использованием клеток крови здоровых доноров по стандартной методике [8].

Результаты и обсуждение

После окисления углеводов МКАТ NaIO_4 и последующей конъюгации с Biotin-LC-Hydrazide все исследованные МКАТ имели включенную биотиновую метку. Степень «биотинилирования» МКАТ и, следовательно, «окисленность» олигосахаридов мы оценивали косвенно по их реакции с STREPT-FITC, исследуя продукт МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин (табл. 1).

Как видно из табл. 1, все исследованные МКАТ имели плотность включения флуоресцеина от 2 до 4,5 молей на моль МКАТ. Такая степень включения метки вполне согласуется с ранними результатами по изготовлению работоспособных МКАТ при прямом включении флуоресцеин-изотиоцианата [9]. Плотность включения флуоресцеина в МКАТ незначительно менялась при изменении концентрации

Таблица 1. Характеристика конечного продукта синтеза МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин*

Характеристика продукта	Модифицированные МКАТ					
	ICO 31	ICO 86	ICO 90	ICO 150	ICO 160	ICO 180
Метод выделения МКАТ	КК	КК	Prt A**	3 ст***	КК	PrtA**
Концентрация МКАТ	0,7	0,4	0,6	0,4	0,5	0,6
Отношение флуоресцеин/белок	1,8	3,94	2,6	4,5	2,5	2,6

Примечание. МКАТ – моноклональные антитела; КК – каприловая кислота; * периодатное окисление проводили 10 мМ NaIO₄; ** PrtA – хроматография на белке А; *** – трехступенчатый метод фракционирования МКАТ (сульфатное осаждение, ионообменная хроматография и гель-фильтрация).

окислителя на 1-м этапе в диапазоне от 1 до 10 мМ NaIO₄ (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика конечного продукта синтеза МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин для ICO90, окисленного различными концентрациями NaIO₄

Характеристика продукта	Концентрации NaIO ₄		
	1 мМ	5 мМ	10 мМ
Концентрация МКАТ	0,52	0,49	0,6
Отношение флуоресцеин/белок	2,9	3,0	2,6

На характеристики полученных конъюгатов МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин не оказывал заметного эффекта способ их очистки (см. табл. 1). Так, флуоресцентные конъюгаты МКАТ 3 клонов (ICO31, ICO86 и ICO160) были получены самым грубым методом очистки – с помощью КК, 2 – ICO90 и ICO180 – на белке А, ICO150 – подвергнут самой тщательной 3-ступенчатой очистке. Вместе с тем максимальное соотношение флуоресцеин/белок отмечалось именно для ICO 150.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для 6 исследованных образцов МКАТ серии ICO, фракционированных тремя различными методами, окисление NaIO₄ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ в течение 30 мин при 25 °С, дальнейшее взаимодействие с Biotin-LC-Hydrazide и STREPT-FITC

приводит к образованию комплекса МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин с количеством флуоресцеиновых групп не менее 2 на молекулу МКАТ.

На следующем этапе было проведено исследование способности полученных комплексов МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин взаимодействовать с лимфоцитами человека в прямой РИФ. Контрольными значениями служили данные о непрямой РИФ с нативными, немодифицированными МКАТ тех же клонов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, все модифицированные МКАТ сохраняли специфичность связывания с клетками-мишенями, присущую нативным антителам. Примеры гистограмм распределения меченых клеток для двух МКАТ (ICO31 и ICO180) приведены на рис. 1 и 2.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали принципиальную возможность использования олигосахаридной части молекулы иммуноглобулинов МКАТ серии ICO для приготовления флуоресцентных конъюгатов. Установлено, что степень включения флуоресцентной метки принципиально не зависит от метода фракционирования МКАТ. Определены оптимальные условия для проведения такого рода конъюгации. Данный метод может быть альтернативой для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, для которых методы белкового синтеза приводят к потере активности конъюгата.

Таблица 3. Специфическое связывание комплекса МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин с лимфоцитами человека в реакции иммунофлуоресценции

Характеристика	МКАТ					
	ICO 31	ICO 86	ICO 90	ICO 150	ICO 160	ICO 180
	CD8	CD4	CD3	CD24	CD95	CD20
% выявляемых данных МКАТ клеток от контроля той же специфичности	97	49	95	100	95	102

Примечание. МКАТ – моноклональные антитела.

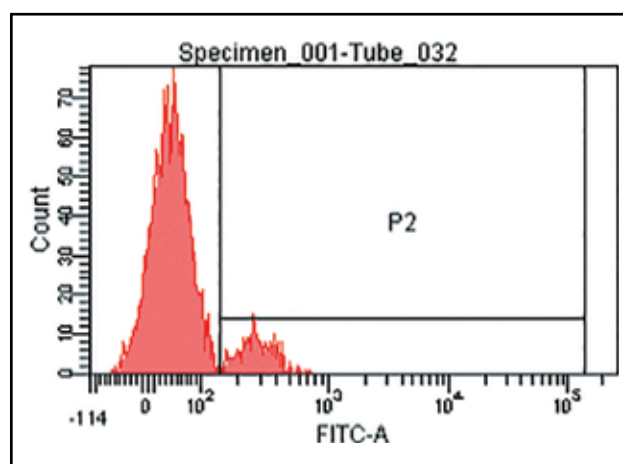
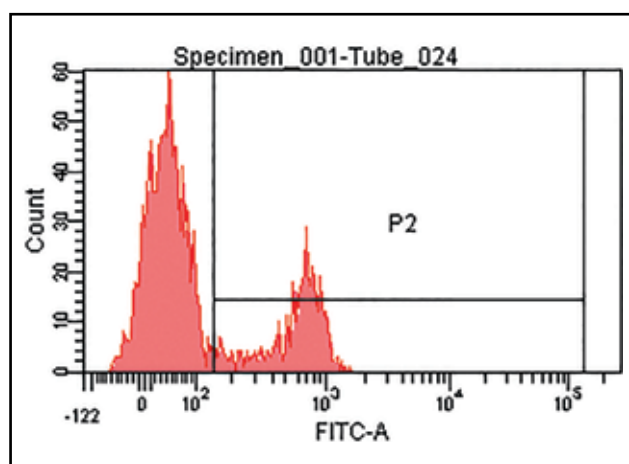
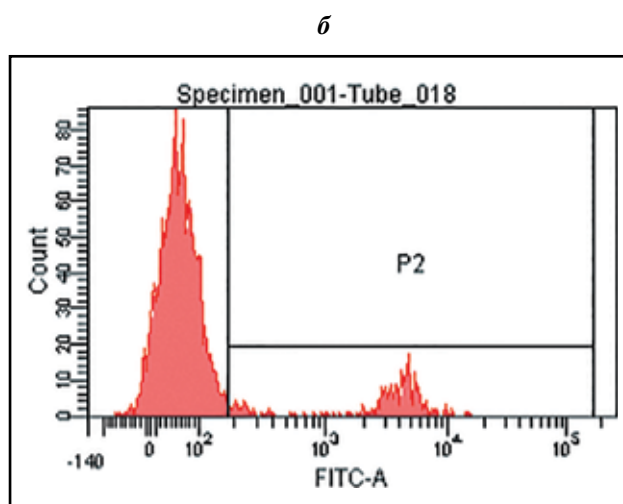
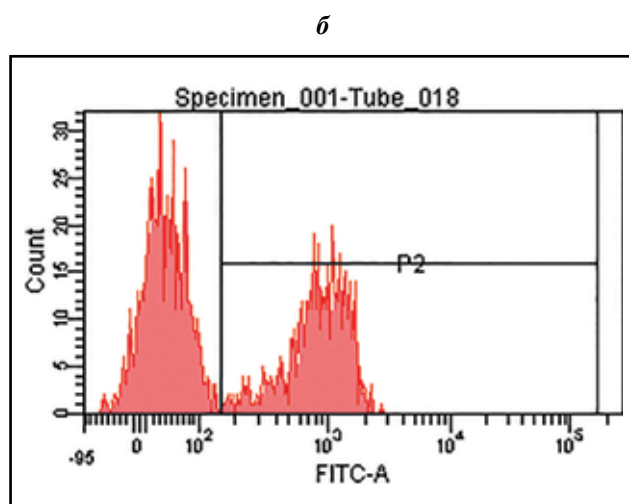
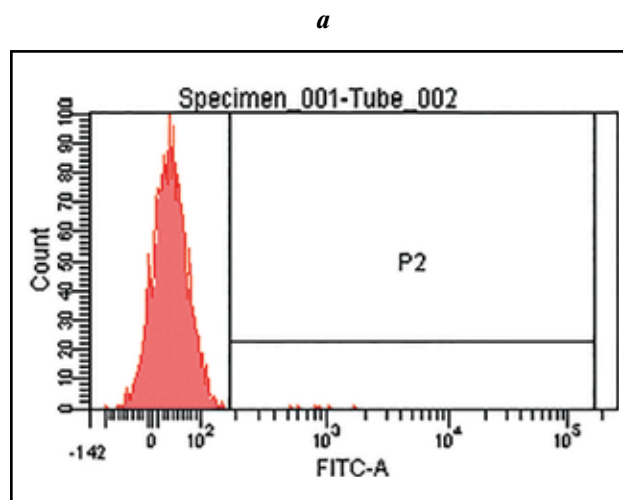
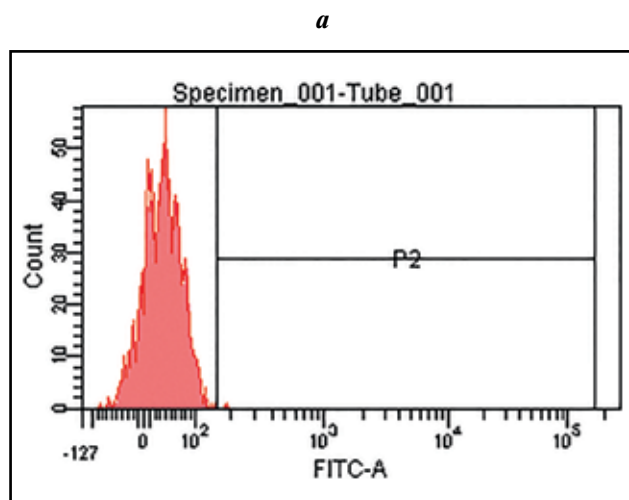


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток при взаимодействии с МКАТ ИСО31: а — неокрашенный контроль; б — непрямая РИФ с ИСО31 в концентрации 5 мкг/мл, проявленная Fab^2 -антимышными антителами, меченными FITC; в — прямая РИФ с комплексом ИСО31-[спейсер]-флуоресцеин в концентрации 10 мкг/мл

Рис. 2. Гистограммы распределения клеток при взаимодействии с МКАТ ИСО180: а — неокрашенный контроль; б — непрямая РИФ с ИСО180 в концентрации 5 мкг/мл, проявленная Fab^2 -антимышными антителами, меченными FITC; в — прямая РИФ с комплексом ИСО180-[спейсер]-флуоресцеин в концентрации 5 мкг/мл

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Buchowicz I., Zakrzewski K. Carbohydrate oxidation and antibody function in equine anti-diphtheria immunoglobulin T. *Immunochemistry* 1975;12:795–800. PMID: 173648.
2. Hage D.S., Wolfe C.A., Oates M.R. Development of a Kinetic Model To Describe the Effective Rate of Antibody Oxidation by Periodate. *Bioconjugate Chem* 1997;8(6):914–20. DOI: 10.1021/bc970112o. PMID: 9404666.
3. Hermanson G.T. *Bioconjugate techniques*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2013.
4. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978;15(7):429–36. PMID: 30693.
5. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-406 против антигена CD117. *Российский онкологический журнал* 2015;2:99–104.
6. Temponi M., Kageshita T., Perosa F. et al. Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification. *Hybridoma* 1989;8:85–95. DOI: 10.1089/hyb.1989.8.85. PMID: 2784406.
7. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. PMID: 5432063.
8. Толчева Е.В., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-от5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к от5⁺-клеткам. *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4:38–43.
9. Murata M., Kawamura A.Jr. Effect of molar ratio of fluorescent dye to IgG on the detection of lymphocyte surface immunoglobulins by immunofluorescence. *Microbiol Immunol.* 1980;24(1):65–78. PMID: 6767174.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА BRCA1 В ТКАНИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, Е.А. Шестакова, А.Н. Гришанина, Е.А. Богуш, В.Ю. Кирсанов, О.М. Рябинина, Н.О. Вихлянцева

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Анатольевна Богуш labmedchem@mail.ru

Введение. Нарушение функционирования BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, включая рак молочной железы (РМЖ), рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак поджелудочной железы. Недавно продемонстрирована прогностическая и предиктивная значимость BRCA1, белка репарации ДНК ERCC1 в плане характера течения заболевания и чувствительности/резистентности к химиотерапии, но заключения неоднозначны.

Цель исследования — уточнение возможной прогностической значимости экспрессии в опухоли BRCA1 путем проведения строго количественной оценки уровня маркера в ткани РМЖ у пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом в соответствии со статусом рецепторов эстрогенов (РЭ) в опухолях, различающихся по чувствительности к препаратам платины.

Материалы и методы. Оценка экспрессии BRCA1 проведена в 50 хирургических образцах РМЖ (40 — с положительным статусом РЭ и 10 — с отрицательным) с использованием количественного иммунофлуоресцентного метода, сопряженного с проточной цитофлуориметрией. Суспензии клеток опухоли инкубировали с первичными антителами к BRCA1 (SD118, Calbiochem) и со вторичными флуоресцентными антителами (DyLight650, ab98729, Abscam). Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Показатели экспрессии BRCA1 анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 с использованием статистического метода Колмогорова — Смирнова. Уровень экспрессии BRCA1 определяли как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества исследованных.

Результаты. Экспрессия BRCA1 идентифицирована во всех исследованных образцах ткани РМЖ со средним значением уровня экспрессии $36,8 \pm 7,6$ % и медианой 37 %. При расчете t-критерия Стьюдента отмечено статистически значимое различие средних значений уровня экспрессии BRCA1 ($p = 0,02$) в группах больных с положительным и больных с отрицательным статусом РЭ ($38,0 \pm 7,5$ и $32,0 \pm 6,3$ % соответственно). Сравнение уровня экспрессии BRCA1 с использованием теста Манна — Уитни также выявило статистически значимое различие ($p = 0,016$). Различия в средних значениях уровня экспрессии BRCA1 оказались особенно выраженными ($p = 0,007$) при сравнении групп пациентов с положительным и с отрицательным статусом РЭ со значениями экспрессии BRCA1 меньше медианы ($32,4 \pm 5,0$ и $26,8 \pm 2,9$ % соответственно). При сравнении показателей экспрессии BRCA1 в опухолях с негативным статусом РЭ и медианы уровня экспрессии BRCA1 по всей группе исследованных опухолей (37 %) выявлена корреляция сниженного уровня экспрессии BRCA1 с отрицательным статусом РЭ в опухоли. Значения уровня экспрессии белка BRCA1 ниже медианы выявлены у 80 % пациентов с отрицательным статусом РЭ в опухоли, выше медианы — в 20 % случаев соответственно.

Выводы. Результаты исследований показали, что белок BRCA1 экспрессируется на различном уровне в опухолевой ткани у всех пациентов с РМЖ. Пониженный уровень экспрессии BRCA1 выявляется чаще в РЭ-негативных по сравнению с РЭ-позитивными опухолями, а отсутствие РЭ в ткани РМЖ является неблагоприятным фактором прогноза, соответственно пониженный уровень экспрессии BRCA1 имеет неблагоприятное прогностическое значение.

Ключевые слова: BRCA1, рецепторы эстрогенов, рак молочной железы, проточная цитофлуориметрия, прогноз

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-49-52

QUANTITATIVE ESTIMATION OF BRCA1 PROTEIN EXPRESSION IN BREAST CANCER TISSUE USING THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush, E.A. Dudko, E.A. Shestakova, A.N. Grishanina, E.A. Bogush, V.Ju. Kirsanov, O.M. Ryabinina, N.O. Vichljantzeva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. The disruption of BRCA1 function leads to the development of several cancers including breast cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, gastric cancer, pancreatic cancer. Recently it was demonstrated that BRCA1 protein as well as another DNA repair protein, ERCC1, could be prognostic markers of the course of the disease and predictive markers of platinum-based chemotherapy efficiency. Nevertheless, the obtained data are controversial.

Aim. In current study the comparison of BRCA1 expression in breast cancer with favorable and unfavorable prognosis based on estrogen receptor status (ER⁺ and ER⁻) was carried out to evaluate its potential prognostic significance for subsets of breast cancer with different platinum chemotherapy sensitivity.

Materials and methods. The estimation of BRCA1 expression was made in 50 samples of breast cancer tissue (40 ER⁺ and 10 ER⁻) using the quantitative immunofluorescent method coupled with flow cytometry. Tumor cell suspensions were incubated with primary anti-BRCA1 antibodies (Abs) (SD118, Calbiochem) and secondary fluorescent Abs (DyLight650, ab98729). Cell fluorescence was measured at the Flow Cytometer FACSCanto II (Becton Dickinson, USA) using the program FACSDiva 6.0. The level of BRCA1 expression was analyzed using the program FlowJo 10.0 with statistical approach of Kolmogorov-Smirnov. The level of BRCA1 expression was determined as the ratio of specifically fluorescent cells to the total number of cells.

Results. 1. The expression of BRCA1 was revealed in all breast cancer samples with mean expression level 36.8 ± 7.6 % and median 37 %. 2. Using the method of Student t-test statistically significant difference in mean value of BRCA1 expression level ($p = 0.02$) was revealed between ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups (38.0 ± 7.5 % and 32.0 ± 6.3 %, respectively). 3. Comparison of BRCA1 expression level in ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups using Mann – Whitney test also demonstrated statistically significant difference ($p = 0.016$). 4. These differences in mean value of BRCA1 expression level were especially prominent ($p = 0.007$) upon the comparison of ER⁺ and ER⁻ breast cancer groups with BRCA1 expression levels below median (32.4 ± 5.0 % and 26.8 ± 2.9 %, respectively). 5. Comparison of BRCA1 expression levels in ER⁻ breast tumors and the median for all studied breast cancer samples (37 %) demonstrated the correlation of decreased level of BRCA1 expression and negative ER status of the tumor. BRCA1 expression levels below the median were shown for 80 % of breast cancer patients with negative ER status in tumor, and over the median – in 20 % of cases, respectively.

Conclusion. The results of current studies demonstrated that BRCA1 protein is expressed at different levels in the tumor tissue of all breast cancer patients. Lower level of BRCA1 expression in ER-negative as compared to ER-positive tumors, and established unfavorable prognostic value of ER-negative breast cancer status point to poor prognostic value of lower level of BRCA1 expression.

Key words: BRCA1, estrogen receptors, breast cancer, flow cytometry, prognosis

Введение

Нарушение функционирования BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний [1]. Кроме того, продемонстрирована прогностическая и предиктивная значимость показателей экспрессии белка BRCA1 при лечении рака молочной железы (PMЖ) [2, 4] и опухолей других локализаций [3, 5]. Однако данные эти немногочисленны и часто противоречивы, поэтому до настоящего времени, в отличие от генетических характеристик BRCA1, оценка BRCA1 в клинической практике не проводится. В то же время определение белка BRCA1 имеет важное преимущество, поскольку учитывает не только наличие мутации, приводящей к дисфункции белка, но и эпигенетические механизмы, ведущие к уменьшению экспрессии этого опухолевого маркера.

Цель исследования — уточнение возможной прогностической значимости экспрессии в опухоли BRCA1 путем проведения строго количественной оценки уровня маркера в ткани PMЖ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом в соответствии со статусом рецепторов эстрогенов (РЭ) в опухоли.

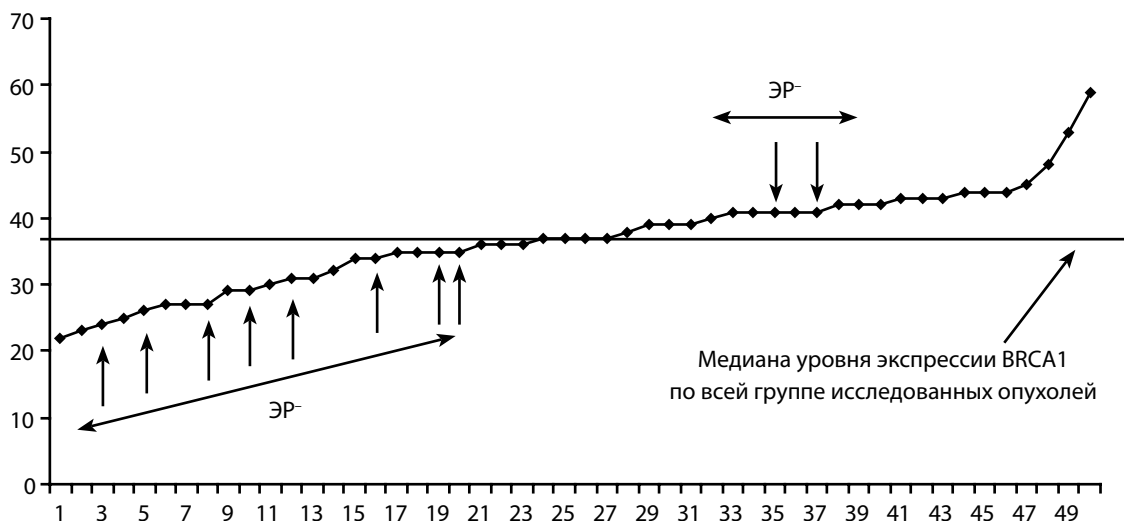
Материалы и методы

Оценка экспрессии BRCA1 проведена в 50 хирургических образцах PMЖ с использованием количественного иммунофлуоресцентного метода, сопряженного

с проточной цитофлуориметрией [6]. В работе использовали первичные антитела к BRCA1 (SD118, Calbiochem) в концентрации 0,025 мкг/мл и вторичные флуоресцентные антитела (DyLight650, ab98729, Abcam) в концентрации 0,5 мкг/мл. Для удаления из анализа дебриса и эритроцитов использовали специфический краситель ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты, которые выводились из анализа путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Использовали гелий-неоновый и диодный УФ- лазеры с длиной волны испускаемого света 633 и 405 нм соответственно. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight 650 и Hoechst 33258 проводили по параметру APC-A и Pacific Blue соответственно. Значение порога по параметру FSC-A составляло 12,5 тыс., показатель «количество событий/с» — средний, число анализируемых событий — 5 тыс.

Уровень экспрессии BRCA1 (процентное содержание специфически окрашенных клеток) анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 и статистического метода Колмогорова—Смирнова. Обработку



Уровень экспрессии *BRCA1* в ткани рака молочной железы (PMЖ): по оси ординат — уровень экспрессии *BRCA1* (процент клеток, экспрессирующих маркер); по оси абсцисс — номера исследованных образцов PMЖ, ранжированных по уровню экспрессии *BRCA1* (от меньшего к большему). Горизонтальная линия — медиана значений уровня экспрессии *BRCA1* в ткани PMЖ по всей группе исследованных образцов опухоли. ЭР⁻ — PMЖ с отрицательным статусом эстрогеновых рецепторов. Стрелками отмечены значения уровня экспрессии *BRCA1* в ткани PMЖ с отрицательным статусом рецепторов эстрогенов

количественных данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 фирмы StatSoft (США). Методы статистической обработки указаны при описании полученных результатов.

Результаты и обсуждение

Экспрессия *BRCA1* идентифицирована во всех исследованных образцах ткани PMЖ со средним значением уровня экспрессии маркера $36,8 \pm 7,6$ % клеток, экспрессирующих маркер (см. рисунок). Отмечены значительные различия показателя у всех обследованных пациентов. Минимальный уровень экспрессии составил 22 %, максимальный — 59 % при медиане показателя — 37 % клеток, экспрессирующих *BRCA1*.

Для выявления возможной прогностической значимости *BRCA1* в оценке агрессивности течения PMЖ проведено сравнение уровня маркера в подгруппах с разным прогнозом течения болезни по показателю статуса РЭ в опухоли. Учитывая малочисленность группы пациентов с отрицательным статусом РЭ в опухоли ($n = 10$), что не позволило точно установить нормальность распределения показателей, в работе использованы 2 статистических критерия (параметрический и непараметрический) с целью дополнительного уточнения значимости выявленных различий.

Так, при оценке с применением t-критерия Стьюдента выявлено статистически значимое ($p = 0,02$) различие в средних значениях уровня экспрессии *BRCA1* при сравнении подгрупп с положительным и отрицательным статусом РЭ в опухоли — $38,0 \pm 7,5$

и $32,0 \pm 6,3$ % соответственно. Сходным был результат аналогичного сравнения при использовании теста Манна–Уитни ($p = 0,016$).

Высокозначимым оказалось различие между средними значениями уровня экспрессии *BRCA1* меньше медианы (< 37 % клеток, экспрессирующих маркер) в подгруппах с положительным и с отрицательным рецепторным статусом опухоли — $32,4 \pm 5,0$ и $26,8 \pm 2,9$ % соответственно (t-критерий Стьюдента, $p = 0,007$).

И наконец, показано, что в подгруппе пациентов с уровнем *BRCA1* ниже медианы показателя по всем обследованным пациентам количество случаев с отсутствием экспрессии РЭ в опухоли составило 80 %, тогда как в подгруппе с показателем экспрессии *BRCA1* выше медианы — только 20 % (см. рисунок).

Выводы

Исследование показало, что в ткани PMЖ у разных пациентов белок *BRCA1* экспрессируется на различном уровне. При этом средние значения экспрессии *BRCA1* в опухолях с положительным статусом РЭ оказались выше по сравнению с уровнем маркера в опухолях с негативным рецепторным статусом. Более того, число опухолей с негативным статусом РЭ в подгруппе пациентов с экспрессией *BRCA1* ниже медианы показателя в целом по всей группе исследованных опухолей в 4 раза превышает частоту таких опухолей при уровне *BRCA1* выше медианы показателя по группе в целом.

Если принимать во внимание тот факт, что отсутствие РЭ в опухоли является общепризнанным неблагоприятным прогностическим маркером PMЖ,

полученные данные указывают на неблагоприятное прогностическое значение пониженного уровня экспрессии белка BRCA1 в опухолевой ткани.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№ 15-04-06991-а и 16-34-01049-мол-а) и грантом Президента РФ МК-7709.2016.7.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Clark S., Rodriguez A.M., Snyder R.R. et al. Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* 2012;1(1).pii:e201204005. PMID: 22737296. PMCID: PMC3380633.
2. Mullan P.B., Gorski J.J., Harkin D.P. BRCA1 — a good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochim Biophys Acta* 2006 Dec;1766(2):205–16. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16919882.
3. Quinn J.E., James C.R., Stewart G.E. et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7413–20. PMID:18094425.
4. Silver D.P., Richardson A.L., Eklund A.C. et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010 Mar 1;28(7):1145–53. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4725. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100965. PMCID: PMC2834466.
5. Weberpals J.I., Tu D., Squire J.A. et al. Breast cancer 1 (BRCA1) protein expression as a prognostic marker in sporadic epithelial ovarian carcinoma: an NCIC CTG OV.16 correlative study. *Ann Oncol* 2011 Nov;22(11):2403–10. DOI: 10.1093/annonc/mdq770. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21368065.
6. Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета, сер. 2. Химия* 2011; 52(4):305–12.

ПРОЯВЛЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ PRAME

Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин, Ю.П. Финашутина, Т.В. Ахлынина, Л.А. Кесаева, В.В. Тихонова,
Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Всеволод Андреевич Мисюрин vsevolod.misyurin@gmail.com

Введение. Белок PRAME является перспективной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии, так как не экспрессируется в здоровых тканях, но активен в опухолевых клетках многих гистологических типов. Нами были разработаны мышиные моноклональные антитела (МКАТ) 5D3F2 и 6H8F12, распознающие эпитопы белка PRAME.

Цель исследования — определение эффектов, оказываемых МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 на клетки, экспрессирующие ген PRAME на различных уровнях.

Материалы и методы. Использовались линии клеток NOMO-1 и WI-38 с низким уровнем экспрессии PRAME, THP-1 — со средним уровнем экспрессии, K562 и WI-38-PRAME — с высоким уровнем экспрессии PRAME. Проводилось инкубирование данных линий клеток с МКАТ 5D3F2 и 6H8F12. Конечная концентрация МКАТ в культуральной среде составила от 6 до 120 мкг/мл. Проводился подсчет клеток после инкубирования МКАТ после 24, 48 и 72 ч эксперимента. Количество мертвых клеток оценивали при проведении МТТ-теста после 24 ч инкубирования клеток с МКАТ 6H8F12.

Результаты. Скорость роста клеток замедлилась при инкубировании в присутствии МКАТ. Эффект замедления роста клеток увеличивался напрямую с ростом концентрации МКАТ в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$). Рост клеток линии K562 был значимо меньшим, чем линии THP-1 ($p = 0,0061$), NOMO-1 ($p = 0,0005$) и WI-38 ($p = 0,0002$), в присутствии одинакового количества МКАТ 6H8F12. Скорость роста клеток линии K562 была ниже, чем клеток линии WI-38-PRAME ($p = 0,0027$), несмотря на одинаковый уровень экспрессии гена PRAME. Влияние МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 на скорость роста клеток было сопоставимым ($p = 0,3946$). Согласно данным МТТ-теста в линиях K562 и WI-38-PRAME погибло сопоставимое количество клеток после 24 ч инкубирования с МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 ($p = 0,8405$). При тех же условиях погибло меньше клеток линии THP-1, чем K562 ($p = 0,6335$). По сравнению с K562 в линиях NOMO-1 и WI-38 погибло существенно меньшее количество клеток ($p = 0,0026$ и $p = 0,0005$ соответственно).

Заключение. Показано, что МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 проявляют существенный цитотоксический эффект в отношении клеток, экспрессирующих PRAME. При более высоком уровне экспрессии гена PRAME в клетках цитостатический эффект более сильный.

Ключевые слова: PRAME, моноклональные антитела, гибель клеток

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-53-58

DEVELOPMENT OF CYTOSTATIC EFFECT OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE PROTEINS PRAME

N.A. Lyzhko, V.A. Misyurin, Y.P. Finashutina, T.V. Akhlynina, L.A. Kesaeva, V.V. Tikhonova,
N.N. Kasatkina, O.N. Solopova, M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe sh., Moscow, 115478, Russia

Introduction. PRAME protein is a promising target for cancer immunotherapy. PRAME is not expressed in normal tissues, but active in number of the tumor types. We have developed the mouse monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12 against PRAME epitopes.

Aim. To determine the effects provided by the monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12 against the cells with different levels of PRAME gene expression.

Materials and methods. We used different cell lines: NOMO-1 and WI-38 with low levels of expression PRAME; THP-1 with intermediate level of PRAME expression; K562 and WI-38-PRAME with high level of PRAME expression. We incubated these cell lines in the presence of monoclonal antibodies 5D3F2 and 6H8F12. The final concentration of monoclonal antibodies in culture varied from 6 pg/ml to 120 mcg/ml. The live cells were counted at the 24, 48 and 72 hours after incubation. The number of dead cells was evaluated by the MTT-test after 24 hours.

Results. Cell growth rate is significantly decreased during incubation with monoclonal antibodies. This effect is correlated with increase of monoclonal antibody concentrations (Pearson coefficient 0,67; $p = 0,0219$). K562 growth rate was much less compared to the THP-1's rate ($p = 0,0061$), NOMO-1 ($p = 0,0005$) and WI-38 ($p = 0,0002$) in the presence of the same amount of monoclonal antibody 6H8F12. K562 cell growth rate was lower than the WI-38-PRAME's rate ($p = 0,0027$), despite the comparable level of PRAME expres-

sion. Effects of monoclonal antibody 5D3F2 and 6H8F12 were similar ($p = 0,3946$). According to the MTT-test, the comparable number of death cells in K562 and WI-38-PRAME was observed ($p = 0,8405$). Under the same conditions the amount of death cells in THP-1 was smaller than K562 ($p = 0,6335$). To compare with K562, fewer cells died in NOMO-1 and WI-38 ($p = 0,0026$ and $p = 0,0005$, respectively).

Conclusion. It was shown that monoclonal antibody 5D3F2 and 6H8F12 exhibit a significant cytotoxic effect against PRAME-expressing cells. In case of higher levels of PRAME expression the cytotoxic effect was stronger.

Key words: PRAME, monoclonal antibodies, cell death

Введение

Раково-тестикулярный антиген PRAME является перспективной мишенью для иммунотерапии онкологических заболеваний, так как данный белок не экспрессируется в большинстве тканей здорового взрослого человека, но широко распространен в опухолевых клетках [1]. В качестве средства терапии PRAME-позитивных онкологических заболеваний могут быть использованы моноклональные антитела (МКАТ), специфически распознающие PRAME. Важным условием для применения препарата на основе МКАТ является расположение целевого антигена на поверхности клетки [2].

Имеются данные, указывающие на то, что PRAME может находиться на внешней мембране клеток. Так, на поверхности эпителиальных клеток человека были обнаружены белки, называемые OIPs (Opa-interacting proteins), которые ассоциируются с белками Опа гонококков, что позволяет паразиту распространяться. Гены, кодирующие OIPs, выделены и изучены. Согласно результатам секвенирования ген одного из найденных OIPs (OIP4) полностью идентичен гену *PRAME* [3]. Результаты этой работы подтверждаются нашими собственными данными о том, что PRAME локализован на клеточной мембране [4]. Это является доводом в пользу разработки терапевтического МКАТ, распознающего PRAME.

Связывание антитела с поверхностным антигеном, как правило, не оказывает влияния на клетку-мишень. Лизис клеток чаще всего вызван привлечением иммунных клеток или молекул системы комплемента [5]. Однако в некоторых случаях может происходить стимулированная антителом передача сигнала от связанного рецептора [6]. К примеру, МКАТ, распознающие рецептор клеточной гибели Fas, могут вызывать апоптоз, заменяя собой лиганд [7, 8]. Группа C.L. Dobson и соавт. разработала МКАТ, стимулирующие апоптоз благодаря распознаванию рецепторов TRAIL-R1 и TRAIL-R2 [9]. Известен и пример стимуляции роста клеток при помощи антитела. М. Maegawa и соавт. обнаружили, что МКАТ B4G7 при связывании со своей мишенью EGFR стимулирует рост линии немелкоклеточного рака легких PC-14 [10].

Согласно данным литературы гибель клеток или же их пролиферация напрямую зависит от типа рецептора,

активированного антителом. Если это рецептор внешнего сигнала апоптоза, можно ожидать гибели клетки. Если это рецептор, предназначенный для распознавания лигандов, стимулирующих рост клеток, при связывании его с антителом будет передаваться сигнал, стимулирующий рост.

Нигде в литературе прямо не сказано, что PRAME является мембранным рецептором. Было установлено, что данный белок может функционировать как цитоплазматический рецептор, предназначенный для распознавания внутриклеточных паразитов, заразивших клетку [11]. Показано, что в ядре белок PRAME активно связывается с NFY-распознаваемыми промоторами и энхансерами и принимает участие в активации транскрипции генов, ответственных за метаболизм и пролиферацию [12]. Известно, что PRAME инактивирует экспрессию гена *TRAIL*, повышая жизнеспособность опухолевой клетки [13]. Представленные данные объясняют, почему гиперэкспрессия *PRAME* при различных онкологических заболеваниях в основном является неблагоприятным фактором. При этом гиперэкспрессия *PRAME* при остром промиелоцитарном лейкозе связана с меньшим риском развития рецидива [14]. Установлено, что в присутствии PRAME инактивируется белок S1004A, за счет чего в клетке повышается уровень экспрессии *TP53*. Стимуляция экспрессии *PRAME* в лейкозных клетках линии KG-1 приводила к их гибели в процессе апоптоза [15]. Понижение уровня экспрессии *PRAME* в клетках рака легких линий PC9 и A549 приводило к ускорению пролиферации. Экспрессия проапоптотических генов при этом падала [16].

Если принимать во внимание локализацию белка PRAME на клеточной мембране и его способность влиять на различные процессы в клетке, последствия связывания PRAME – антитело для опухолевой клетки могут быть различными.

Проводилось изучение влияния мышинового МКАТ 5D3F2 к белку PRAME на пролиферацию клеток мышиной меланомы B16F10, которая была трансфицирована плазмидой со вставкой гена *PRAME* [4]. В результате проведенных экспериментов скорость роста трансфицированной линии B16F10 замедлилась, и более значительный эффект мы обнаружили в присутствии мышинового МКАТ 5D3F2.

Данный эффект, возможно, объясняется тем, что моноклональное антитело 5D3F2 к белку PRAME усилило способность содержащихся в сыворотке белков системы комплемента перфорировать клеточную мембрану, ранее опсонизированную другими мышинными антителами, появившимися в сыворотке в результате успешной иммунизации. Потенциальная возможность прямого цитостатического действия, вызванного МКАТ 5D3F2 без привлечения белков системы комплемента, еще не проверялась.

В связи с этим нами были проведены эксперименты по определению возможных последствий применения моноклональных анти-PRAME-антител при отсутствии белков системы комплемента против экспрессирующих PRAME опухолевых клеток.

Ранее мы определили, что в клетках линии NOMO-1 уровень экспрессии составляет 0,713 %, линии THP-1—44,3 %, линии K652—541 % и линии WI-38—0,0013 % [17]. При помощи вектора pCER4 в клетки WI-38 был введен ген *PRAME*, благодаря чему в полученной линии WI-38-PRAME экспрессировался на уровне 542 % [4]. Опираясь на эти данные, можно классифицировать линии клеток по уровню экспрессии гена *PRAME* как высокоэкспрессирующие (K652 и WI-38-PRAME), среднеэкспрессирующие (THP-1) и низкоэкспрессирующие (NOMO-1 и WI-38). Мы предполагали, что при инкубировании клеток с МКАТ, связывающим белок PRAME, наиболее чувствительными к этому будут клетки высокоэкспрессирующих линий, а наименее чувствительными — клетки низкоэкспрессирующих линий. Это могло быть верным как для линий, в которых ген *PRAME* активен исходно, так и для линии WI-38-PRAME, которая экспрессирует PRAME искусственно. Чувствительность может выражаться в виде изменения скорости роста клеток или повышения доли погибших клеток относительно контрольных.

Материалы и методы

Культуры клеток инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе на среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина сульфата. Клетки WI-38, B16F10 и mel Kог пересевали при достижении конфлюэнтного монослоя с помощью 0,02 % раствора Версена и 0,25 % раствора трипсина.

В опытные линии добавляли МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, разведенные в буферном растворе PBS до достижения их конечной концентрации в культуральной среде соответственно 6, 12, 24 и 120 мкг/мл. В качестве контрольных МКАТ использовали ритуксимаб (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в концентрации 12 и 120 мкг/мл. Культивирование проводилось в течение 72 ч. По истечении 24, 48 и 72 ч проводили оценку скорости роста клеток путем

сравнения абсолютного количества клеток в опытном и контрольном образце. МТТ-тест проводили по прошествии 24 ч от начала эксперимента.

Статистический анализ данных. Каждый эксперимент проводили 3 раза. Для оценки взаимосвязи концентрации МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, распознающих белок PRAME, а также контрольного МКАТ и наблюдаемого цитостатического эффекта вычисляли коэффициент корреляции Пирсона. Для сравнения относительной скорости роста клеток различных линий между собой и доли погибших клеток в различных линиях использовался ранговый дисперсионный анализ Краскела—Уоллиса. Данный непараметрический критерий был выбран исходя из того, что для анализируемых данных не была доказана нормальность распределения значений. Вычисления проводили в программе Statistica 10. Различия считали достоверными при рассчитанном значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Добавление моноклональных антител 5D3F2 и 6H8F12 в выбранных концентрациях в культуральную среду приводило к замедлению скорости роста клеток как в первые, так и в последующие сутки. Рассмотрим это на примере линии K562, инкубированной при разных концентрациях МКАТ 6H8F12 (рис. 1). Эффект замедления роста клеток увеличивался напрямую с ростом концентрации МКАТ в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$), особенно в первые сутки инкубирования ($p < 0,0001$).

Скорость роста клеток K562 снижается одинаково вне зависимости от типа МКАТ. Наблюдается несколько больший эффект от действия антитела 6H8F12 по сравнению с 5D3F2, но без статистически значимой разницы ($p = 0,3946$) (рис. 2).

По сравнению с K562 рост клеток других линий подавлялся статистически значимо меньше (рис. 3). Клетки линии THP-1 росли относительно быстрее, чем линии K562 ($p = 0,0061$). Скорость роста клеток линии WI-38-PRAME также снижалась в присутствии МКАТ, но меньше по сравнению с эффектом, наблюдаемым на линии K562 ($p = 0,0027$). МКАТ 6H8F12 также заметно подавляло рост клеток линии NOMO-1 по сравнению с контролем ($p = 0,0284$), но существенно меньше по сравнению с линией K562 ($p = 0,0005$). Рост клеток линии WI-38 в присутствии МКАТ 6H8F12 замедлялся статистически незначимо ($p = 0,2817$) относительно роста WI-38 в среде без добавления МКАТ и статистически значимо — относительно клеток линии K562, инкубированной с МКАТ ($p = 0,0002$).

Согласно данным МТТ-теста при инкубировании с МКАТ 6H8F12 в наибольшей степени были подвержены гибели клетки линий K562 и WI-38-PRAME.

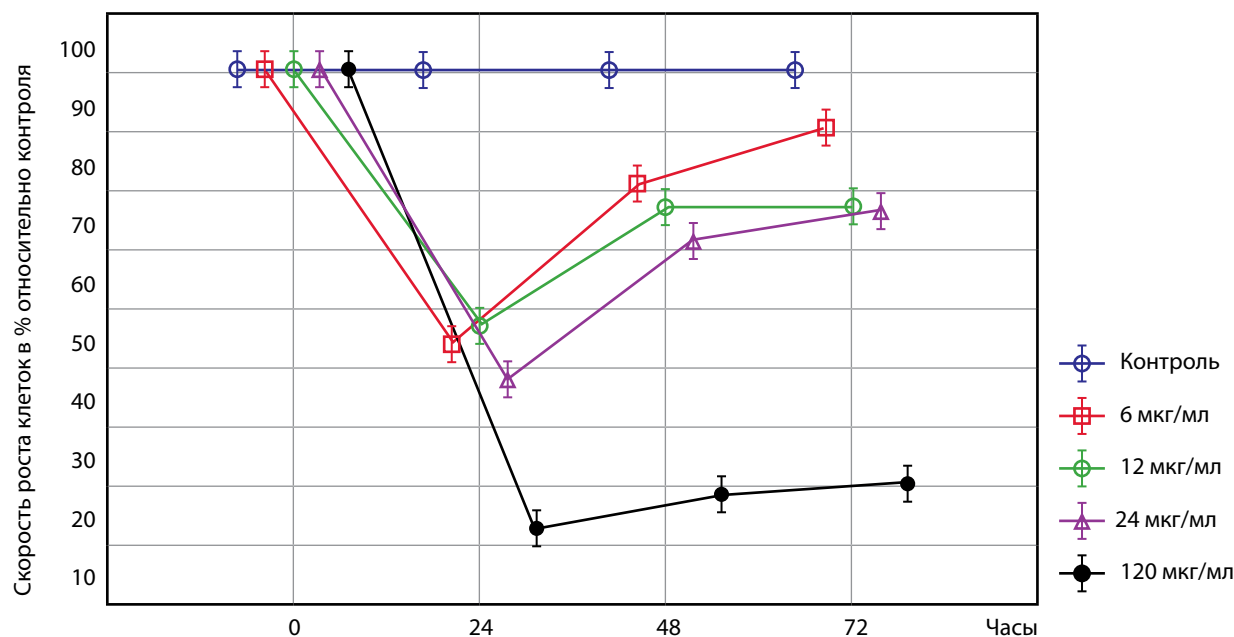


Рис. 1. Динамика роста линии клеток K562 в зависимости от концентрации моноклонального антитела 6H8F12 в культуральной среде

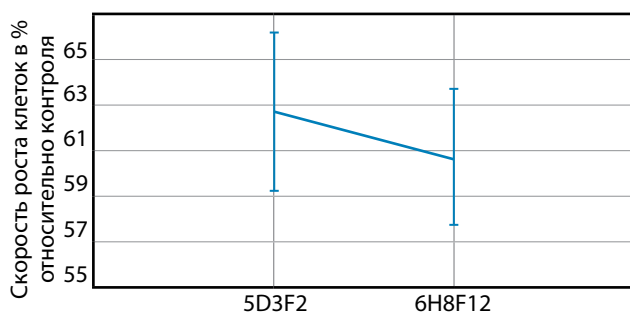


Рис. 2. Сравнение скорости роста клеток линии K562 при инкубировании в присутствии разных моноклональных антител

В обеих линиях при одинаковой концентрации МКАТ 5D3F2 и 6H8F12 погибало сопоставимое количество клеток ($p = 0,8405$) с тенденцией к меньшему выживанию клеток линии K562. В линии THP-1 наблюдалось меньшее число погибших клеток, чем в K562, но без статистически значимой разницы ($p = 0,6335$). Часть клеток линии NOMO-1 также погибла, но количество мертвых клеток было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p = 0,0026$). При инкубировании с МКАТ 6H8F12 практически не изменилось соотношение количества мертвых и живых клеток в линии WI-38 ($p = 0,8452$). Количество погибших клеток в линии WI-38 было статистически значимо меньше, чем в линии K562 ($p = 0,0005$) (рис. 4).

Клетки линии WI-38-PRAME замедлили скорость роста относительно контроля. Среди них была большая доля погибших по сравнению с клетками линии WI-38 ($p = 0,001$ и $p = 0,004$ соответственно).

Как мы и предполагали, моноклональные анти-PRAME-антитела оказали влияние на клетки,

экспрессирующие PRAME. Это выразилось в замедлении скорости роста клеток, причем в прямой зависимости от уровня экспрессии гена.

Высокоэкспрессирующая линия K562 росла значительно медленнее, чем среднеэкспрессирующая THP-1, а линия THP-1, в свою очередь, — медленнее, чем низкоэкспрессирующие линии NOMO-1 и WI-38. Скорость роста клеток линии WI-38-PRAME, в которой экспрессия гена *PRAME* осуществлялась искусственно, снизилась меньше, чем линии THP-1. Скорость роста клеток линий WI-38-PRAME и K562 при одинаковой концентрации МКАТ оказалась несопоставимой, несмотря на то что уровень экспрессии гена *PRAME* в их клетках был одинаковым.

Цитостатический эффект наблюдался при полном отсутствии мышиных сывороточных белков, из чего следует, что антитела, связавшись с антигеном, не могли активировать комплементопосредованный лизис клеток [4]. Причиной снижения скорости роста и гибели части клеток могут быть изменение конформации мембранного белка PRAME после связывания с антителом и возможная передача сигнала в клетку. Этот сигнал может быть подобен сигналу, инициированному Toll-подобными рецепторами, которые имеют сходную с PRAME структуру [11]. Для доказательства прохождения такого сигнала и выяснения последствий этого необходимо провести дополнительные исследования с выборочным ингибированием различных адапторов пути, таких как MyD88 или TRIF [18].

Хотя на данном этапе исследований механизм замедления роста культуры и гибели клеток не был раскрыт, мы доказали факт цитостатического действия

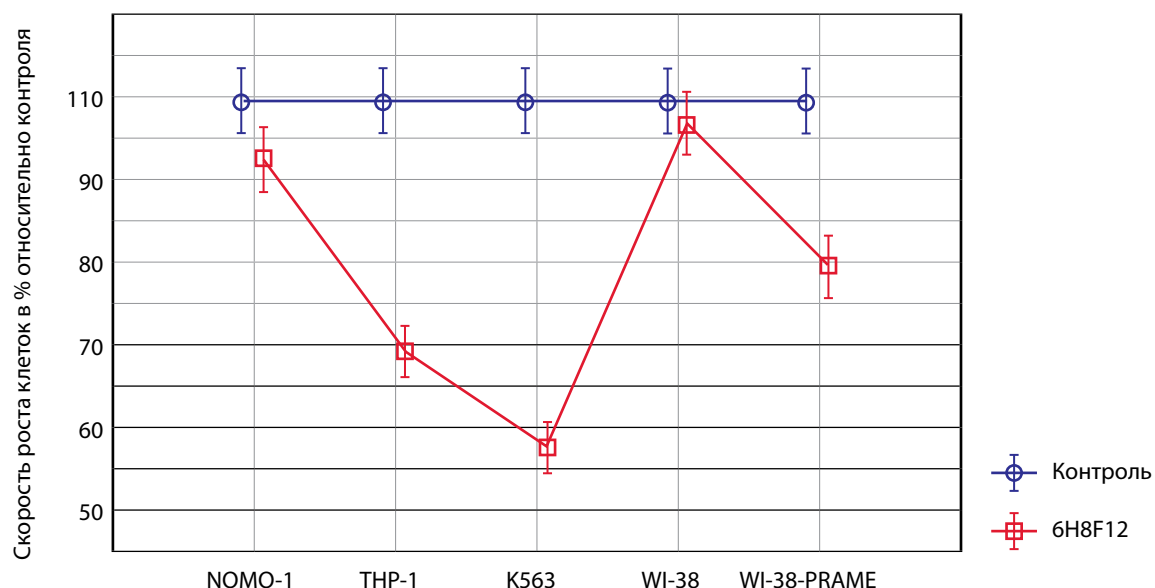


Рис. 3. Сравнение скорости роста клеток различных линий после 24 ч инкубирования в присутствии моноклонального антитела 6H8F12. Начальная концентрация моноклонального антитела составила 120 мкг/мл

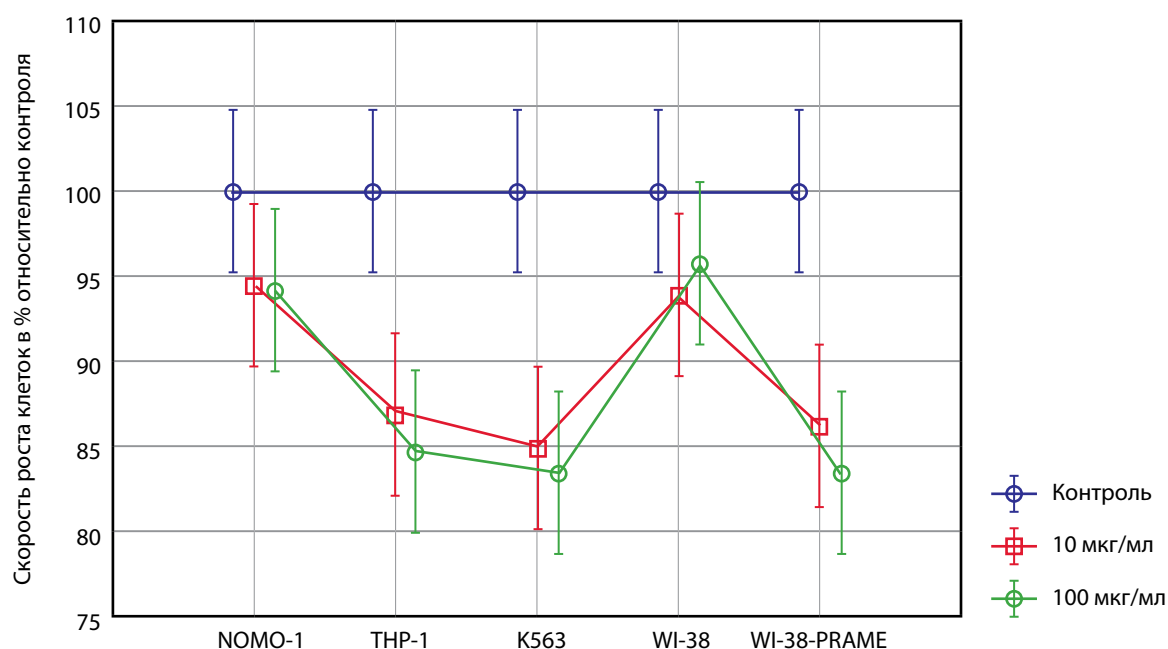


Рис. 4. Сравнение количества погибших клеток различных линий после 24 ч инкубирования в присутствии моноклонального антитела 6H8F12. Начальная концентрация моноклонального антитела составила 100 мкг/мл

моноклональных анти-PRAME-антител, независимо от присутствия молекул системы комплемента или цитотоксических клеток. Чем выше уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках, тем выше их чувствительность к мышинным моноклональным анти-PRAME-антителам 5D3F2 и 6H8F12. Цитостатический эффект и гибель клеток происходят даже в условиях, когда экспрессия гена *PRAME* вызвана искусственно введением этого гена при трансфекции клеток. Низкоэкспрессирующие опухолевые клетки

линии NOMO-1 и неопухолевые клетки линии WI-38 оказались почти не подвержены действию этих моноклональных антител.

Заключение

Клетки с низким уровнем экспрессии гена *PRAME*, такие как неопухолевые клетки линии WI-38, подвержены цитотоксическому действию MKAT 5D3F2 и 6H8F12 в меньшей степени, чем опухолевые клетки линий THP-1 и K562 с более высоким уровнем экспрессии

гена *PRAME*. Терапевтическое антитело, разработанное на основе мышинных МКАТ 5D3F2 и 6H8F12, при сохранении специфичности к белку *PRAME* может обладать не только комплементзависимой и клеточно-опосредованной цитотоксичностью, но также уничтожать опухолевые клетки напрямую, без привлечения активных компонентов иммунной системы больного.

Благодарность

Благодарим руководителя лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России д-ра биол. наук Н.И. Дризе и ведущего научного сотрудника канд. биол. наук Н.И. Оловникову за помощь в получении моноклональных антител.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):77–82.
2. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антител у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2014;11(3):25–8.
3. Williams J. M., Chen G. C., Zhu L., Rest R. F. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. Mol Microbiol 199;27(1):171–86. PMID: 9466265.
4. Лыжко Н.А., Ахлынина Т.В., Мисюрин А.В. и др. Повышение уровня экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):19–30.
5. Stevenson G. T. Three major uncertainties in the antibody therapy of cancer. Haematologica 2014;99(10):1538–1546. DOI: 10.3324/haematol.2013.084640.
6. Bradbury A. R. M., Sidhu S., Dubel S. et al. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. Nature Biotechnology 2011;29:245–54. DOI: 10.1038/nbt.1791.
7. Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 1989;245(4915):301–5. PMID: 2787530.
8. Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989;169(5):1747–56. PMID: 2469768.
9. Dobson C. L., Main S., Newton P. et al. Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent in vitro agonism. MAbs 2009;1:552–62. PMID: 20068388.
10. Maegawa M., Takeuchi K., Funakoshi E. et al. Growth stimulation of non-small cell lung cancer cell lines by antibody against epidermal growth factor receptor promoting formation of ErbB2/ErbB3 heterodimers. Mol Cancer Res 2007;5(4):393–401. DOI: 10.1158/1541–7786.MCR-06–0303. PMID: 17426253.
11. Wadelin F. R., Fulton J., Collins H. M. et al. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the Elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. PLoS One 2013;8(2):e58052. PMID: 23460923.
12. Costessi A., Mahrour N., Tjchou E. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. EMBO J 2011;30(18):3786–98. DOI: 10.1038/emboj.2011.262. PMID: 21822215.
13. De Carvalho D. D., Mello B. P., Pereira W. O., Amarante-Mendes G. P. PRAME/EZH2-mediated regulation of TRAIL: a new target for cancer therapy. Curr Mol Med 2013;13(2):296–304. PMID: 23228130.
14. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов *PRAME* и *PML/RARα* в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):9–16.
15. Xu Y., Rong L.-J., Meng S.-L. et al. PRAME promotes in vitro leukemia cells death by regulating S100A4/p53 signaling. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2016;20:1057–63. PMID: 27049257.
16. Huang Q., Li L., Lin Z. et al. Identification of Preferentially Expressed Antigen of Melanoma as a Potential Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma. Med Sci Monit 2016;22:1837–42. PMID: 27241212.
17. Ахлынина Т.В., Мисюрин А.В., Лыжко Н.А. и др. Наличие иммуногенного антигена в опухолевой клетке способствует антипролиферативному действию дендритных клеток. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(4):23–30.
18. Kawasaki T., Taro K. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Front Immunol 2014;5(461). DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СПОСОБЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

В.И. Карасева, Т.В. Осипова, Ю.М. Букреев

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валентина Ивановна Карасева valent.karaseva43@yandex.ru

Введение. Среди многообразных форм воспаления, многие из которых способствуют росту опухолей, классическая реакция воспаления — гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) — способна их элиминировать. Искусственно индуцированная интратуморально, она может быть успешно применена в иммунотерапии. Известно, что уровень противоопухолевого иммунитета коррелирует с интенсивностью реакции, поэтому мы использовали результаты собственных предварительных исследований, которые позволили повысить уровень ГЗТ в несколько раз. Ранее нами был выявлен парадоксальный механизм разнонаправленного контроля реакции ГЗТ на разных стадиях антигенами II класса МНС-I-A-молекулами, экспрессированными на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Этот факт необходимо строго учитывать при разработке схем иммунотерапии.

Цель исследования — разработка эффективных способов экспериментальной иммунотерапии на основе ГЗТ с использованием средств и способов ее регуляции.

Материалы и методы. Описанный выше феномен использован в разработке 2 способов экспериментальной иммунотерапии карциномы легкого Льюиса у мышей BDF1. ГЗТ к лабораторному антигену овальбумину индуцировали интратуморально и стимулировали точно с учетом разнонаправленности развития реакции либо аспирином (опосредованно повышающим экспрессию I-A-антигенов) в стадии индукции, либо никотиномидом (подавляющим ее) в эффекторной фазе реакции.

Результаты. Показано, что ГЗТ к овальбумину, индуцированная интратуморально и стимулированная аспирином или никотиномидом, обеспечивает торможение роста опухоли соответственно на 81,5 и 86,5 % по сравнению с контролем.

Заключение. Показано 2 способа экспериментальной иммунотерапии опухоли на основе ГЗТ со строгим учетом разнонаправленности контроля реакции I-A-антигенами. Согласно данным литературы в числе агентов, способных изменять экспрессию I-A-молекул, кроме аспирина и никотиномидом есть много известных, широко применяемых в клинике препаратов. Несоблюдение правил разнонаправленности развития ГЗТ при их назначении не только приводит к слабому терапевтическому эффекту, но и может вызвать стимуляцию роста опухоли. Вероятно, в этом кроется причина наблюдаемой непредсказуемости в иммунотерапии. Очевидно, что для разработки адекватных схем лечения необходимо осторожное, точечное вмешательство в ход конкретной защитной иммунной реакции в соответствии с молекулярным механизмом ее регуляции. Полученные результаты могут стать основанием для апробирования подобных методических подходов в клинике.

Ключевые слова: гиперчувствительность замедленного типа, экспериментальная иммунотерапия опухоли, карцинома легкого Льюиса

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-59-64

ADVANCED METHODS OF EXPERIMENTAL CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY

V.I. Karaseva, T.V. Osipova, Yu.M. Bukreev

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. Among the variety forms of inflammation, many of which contribute to the growth of tumors, classical inflammation reaction — delayed type hypersensitivity is able to eliminate. Artificially induced intratumoral it can be used successfully in immunotherapy. As the level of antitumor immunity correlates with the intensity of the reaction, we used the results of our preliminary research, which helped to increase the level of delayed type hypersensitivity several times. Our earlier experiments indicated a paradoxical mechanism of bi-directional control of delayed type hypersensitivity reactions at various stages by antigens class II MHC I-A-molecules, expressed on the surface of antigen-presenting cells. This fact must be strictly taken into account when designing schemes of immunotherapy.

The purpose of the research is development of effective methods for experimental immunotherapy on the basis of delayed type hypersensitivity with the use of means and methods of its regulation.

Materials and methods. The above-described phenomenon was used in the development of 2 methods experimental immunotherapy of carcinoma Lewis in mice BDF1. Delayed type hypersensitivity to laboratory antigen ovalbumin induced intratumoral and stimulated point based bi-directional development of reaction or aspirin in the induction stage (indirectly increasing the expression of I-A-antigens), or (overpowering her) nicotinamide in the effector phase of the reaction.

Results. It is shown that delayed type hypersensitivity to ovalbumin induced intratumoral and stimulated by aspirin or nicotinamide, provides inhibition of tumor growth at 81.5 % and 86.5 % compared with the control, respectively.

Conclusion. It is demonstrated 2 ways of experimental immunotherapy of tumors based on delayed type hypersensitivity, with strict regard to bi-directional control reaction by I-a-antigens. According to the literature in a number of agents capable of altering the expression of I-A-molecules, in addition to aspirin and nicotinamide are a well known, widely used in the clinic drugs. The irregularity of bi-directional development of delayed type hypersensitivity during their appointment subsequently leads not only to the weak therapeutic effect, but may cause increased tumor growth. Probably this is the reason for the observed unpredictability in immunotherapy. Obviously, to develop appropriate treatment regimens need careful, targeted intervention in the specific protective immune response in accordance with its molecular mechanism of regulation. In summary, the results presented here can be the basis for the testing of these methodological approaches in the clinic.

Key words: delayed-type hypersensitivity, experimental immunotherapy, Lewis lung carcinoma

Введение

Известно, что воспаление и развитие злокачественных опухолей связаны друг с другом самым тесным образом, и многие опухоли человека возникают и прогрессируют в местах хронического воспаления [1–4]. Среди разнообразных форм воспаления одни способствуют росту, другие элиминируют уже сформировавшиеся опухоли [5]. К последним относится классическая воспалительная реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Клетки-эффекторы этой строго специфической иммунной реакции продуцируют неспецифический фактор, ингибирующий миграцию (ФИМ) фагоцитирующих клеток, в том числе макрофагов, в очаге воспаления. ФИМ в синергии с фактором некроза опухоли индуцирует выработку нитроксидных радикалов. Благодаря этому механизму искусственно индуцированная интратуморально реакция ГЗТ вызывает инфильтрацию опухоли с последующей ее элиминацией. Этот эффект можно использовать в иммунотерапии.

В норме ГЗТ является природной защитной реакцией. При высокой интенсивности она проявляет повреждающие свойства, которые можно направить против опухоли. Уровень противоопухолевого иммунитета коррелирует с интенсивностью ГЗТ. Ранее с целью поиска средств и способов управления ГЗТ мы исследовали роль I-A-антигенов (I-A-a), экспрессированных на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Эксперименты проводились *in vivo* и *in vitro* на разных стадиях ГЗТ к овальбумину (ОА) — индуктивной и эффекторной [6]. В фундаментальной иммунологии давно установлен тот факт, что средством клеточного взаимодействия всех видов иммунного ответа являются антигены II класса главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) на антигенпрезентирующих клетках. Их количество свидетельствует о степени активности иммунной

системы. Влияя на уровень экспрессии I-A-молекул, можно управлять реакцией ГЗТ.

Результаты наших прежних исследований только в индуктивной фазе ГЗТ подтвердили общепринятое положение о главенствующей роли экспрессии I-A-a на антигенпрезентирующих клетках. В эффекторной стадии было обнаружено иммуносупрессирующее влияние их присутствия. Мы высказали гипотезу о разнонаправленном механизме контроля реакции ГЗТ I-A-молекулами, с помощью которого, вероятно, в организме поддерживается иммуногомеостаз. Этот механизм необходимо учитывать при разработке способов иммунотерапии. Было исследовано влияние на интенсивность ГЗТ различных агентов, которые (по данным литературы) способны повышать или подавлять экспрессию антигенов II класса МНС [7–9]. Показано, что препараты, повышающие уровень экспрессии, такие как аспирин, стимулируют ГЗТ к ОА только в индуктивной фазе, но ингибируют ее в эффекторной, в то время как никотинамид, подавляющий экспрессию I-A-молекул, ингибирует реакцию в ее начальной стадии, но стимулирует в эффекторной. Цель исследования — изучение возможности подавления опухолевого роста у мышей с карциномой легкого Льюиса под влиянием ГЗТ к ОА высокой интенсивности, индуцированной внутри опухоли.

Материалы и методы

В опытах использовали мышей линий Balb/c, C57Bl/6 и гибридов первого поколения BDF1 (C57Bl/6 x DBA2) массой 20–22 г. Животных получали из питомника «Столбовая» и содержали в конвенциональных условиях на брикетированном рационе кормления [10].

Изучение влияния аспирина и никотинамида на интенсивность реакции ГЗТ к ОА на разных стадиях. Исследования проводили на мышах Balb/c согласно

детально разработанному методу [6, 11]. В качестве антигена использовали ОА («Sigma»), в качестве адъюванта — синий Эванса (Sigma).

Для иммунизации животных в 1-й день эксперимента вводили подкожно в межлопаточную область 10 мкг ОА и 250 мкг синего Эванса в общем объеме 0,2 мл физиологического раствора вместе с одним из испытуемых препаратов — аспирином в дозе 0,2 мг в 0,1 мл в стадии индукции или никотиномидом (Sigma) 0,15 мг в 0,2 мл физиологического раствора — для изучения их влияния на уровень ГЗТ в эффекторной стадии. На 5-й день делали активирующую инъекцию 25 мкг ОА в 0,02 мл физиологического раствора вместе с 0,04 мг аспирина или 0,015 мг никотинамида в подушечку правой задней лапы животного для исследования их влияния в эффекторной фазе реакции. В контрольную лапу вводили физиологический раствор. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по разнице масс подопытной (Р_о) и контрольной (Р_к) лап мышей. Индекс реакции (ИР) определяли по формуле:

$$\text{ИР} = (\text{Р}_o - \text{Р}_k) / \text{Р}_k \times 100 \, \%.$$

Изучение противоопухолевой активности реакции ГЗТ к ОА, индуцированной внутри опухоли и стимулированной аспирином или никотиномидом. Работа выполнена на мышцах-самцах С57В1/6 и ВДФ1 на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюиса, полученной из банка опухолевых штаммов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, согласно разработанному методу [12].

Модифицированную нами лабораторную модель ГЗТ к ОА [6] мы перенесли в условия эксперимента с перевиваемой опухолью, точно стимулируя реакцию аспирином или никотиномидом для большей выраженности. Схема постановки эксперимента представлена на рисунке.

Сенсибилизацию мышей ВДФ1 проводили путем подкожного введения в межлопаточную область 10 мкг ОА и 250 мкг синего Эванса в 0,2 мл физиологического раствора в 1-й день иммунотерапии. На 5-й день эксперимента (в эффекторной стадии ГЗТ) вводили разрешающую дозу антигена 500 мкг ОА в 0,6 мл физиологического раствора в область планируемого роста опухоли или в уже развившуюся опухоль.

В 1-м способе стимуляции ГЗТ подкожно вводили 400 мкг аспирина в 0,2 мл физиологического раствора на стадии индукции реакции. Во 2-м способе 5 мг никотинамида вводили в опухоль на эффекторной стадии. Прививку карциномы легкого Льюиса осуществляли на 6-й день иммунотерапии, чтобы совместить ее с началом продукции ФИМ. Эффект оценивали на 10-й день после прививки

опухоли, что соответствовало 16-му дню иммунотерапии. Сенсибилизацию осуществляли на 1, 7 и 10-й дни лечения, а активацию реакции — на 5, 11 и 14-й дни, для того чтобы количества продуцируемого ФИМ хватило на весь период иммунотерапии.

Противоопухолевый эффект оценивали по критериям торможения роста опухоли и увеличения продолжительности жизни (в процентах). Минимальными критериями активности считали показатели более 50 и 25 % соответственно. Полученные данные обрабатывали статистически по стандартному методу Стьюдента. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$.

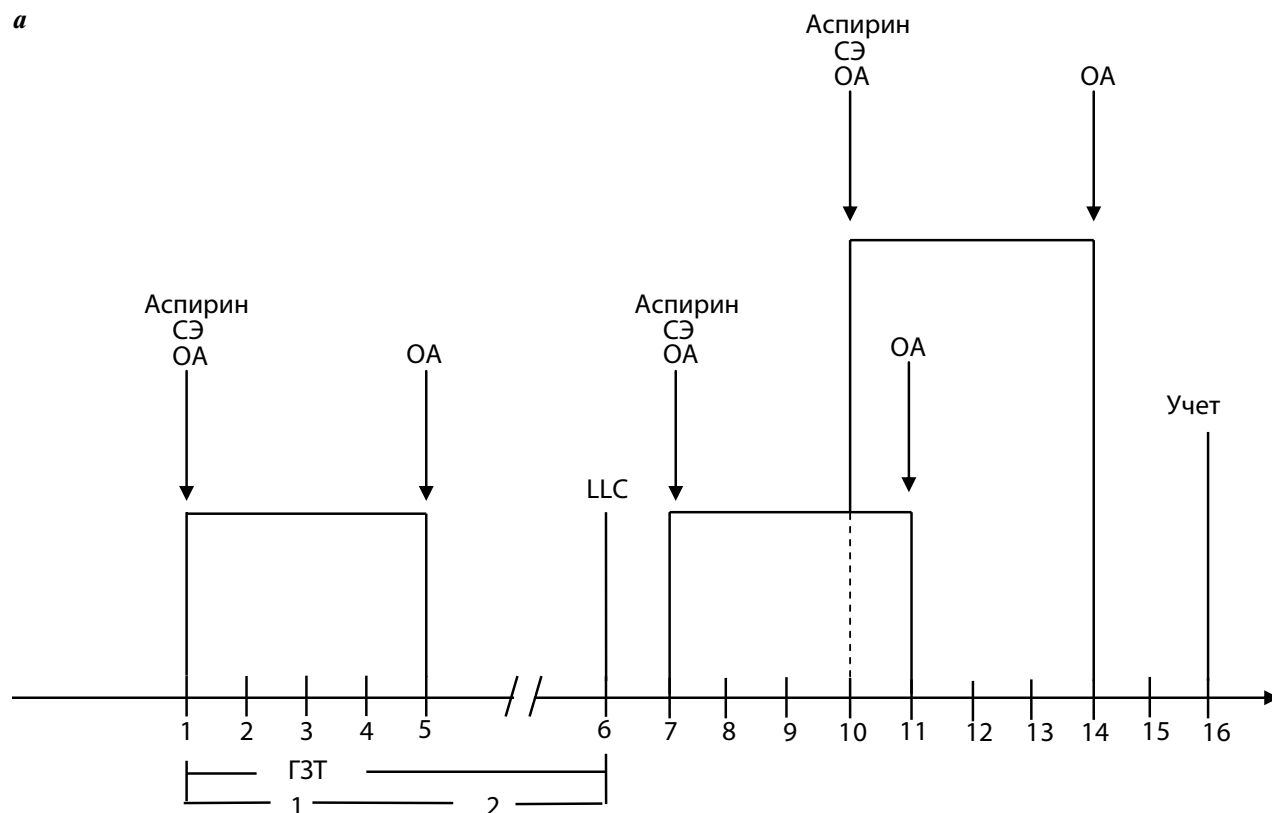
Результаты и обсуждение

При сравнительном исследовании влияния аспирина и никотинамида на разных стадиях ГЗТ к ОА наглядно проявился разнонаправленный характер их действия. Полученные результаты представлены в табл. 1. Как видно, в группе 1 исходный индекс реакции равнялся $18,9 \pm 1,4 \, \%$. Введение аспирина мышам на стадии индукции (группа 2) стимулировало реакцию в 2 раза по сравнению с контролем К-1, повышая ее уровень с $18,9 \pm 1,7$ до $35,5 \pm 0,7 \, \%$ ($p < 0,001$), тогда как введение аспирина в эффекторной фазе (группа 4) приводило к достоверному снижению ее интенсивности до $7,7 \pm 1,5 \, \%$ ($p < 0,02$). Введение никотинамида (группа 6) снижало интенсивность ГЗТ с $18,9 \pm 1,7$ до $6,4 \pm 2,2 \, \%$ ($p < 0,001$) в индуктивной стадии, но повышало в эффекторной — до $30,6 \pm 2,3 \, \%$ ($p < 0,001$) (группа 8). В группах 3, 5, 7, 9 отрицательного контроля без введения ОА сами по себе аспирин и никотинамид не вызывали распухания лапки. Индексы реакции в этих группах составили $3,2 \pm 1,6$; $3,5 \pm 2,4$; $2,9 \pm 0,8$; $2,5 \pm 2,3 \, \%$ соответственно.

Результаты изучения противоопухолевой эффективности ГЗТ представлены в табл. 2. Показано, что стимуляция реакции аспирином приводит к торможению роста опухоли на $81,5 \pm 4,6 \, \%$ ($p < 0,05$), никотиномидом — на $86,5 \pm 2,2 \, \%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Наблюдали статистически значимое увеличение продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными на 31 и 27 %.

В данном сообщении представлено 2 способа подавления роста опухоли с помощью ГЗТ высокой интенсивности. Разнонаправленный механизм регуляции ГЗТ I-A-а диктует необходимость придерживаться особо четкой стратегии иммунотерапии для достижения высокого уровня иммунного ответа. Если этим пренебречь, вместо торможения наблюдается стимуляция роста опухоли (неопубликованные данные). Многие уже известные и хорошо изученные препараты, используемые в клинике, также способны влиять

а



б

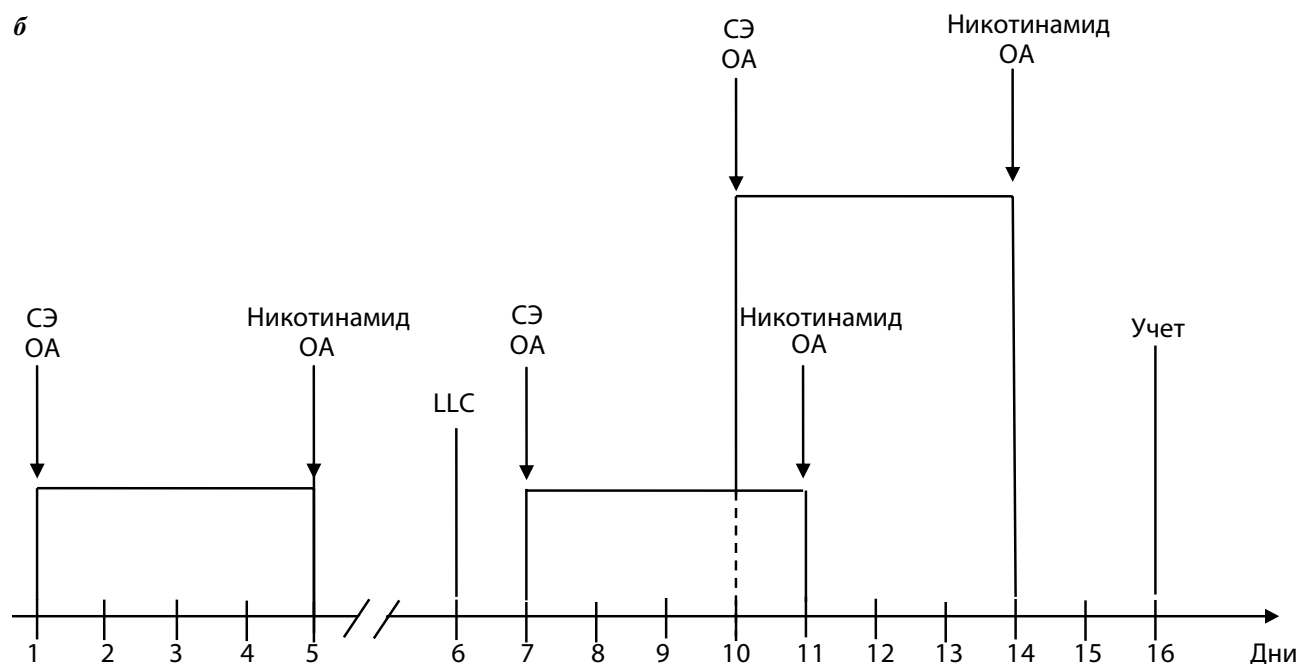


Схема стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа к овальбумину: а – в стадии индукции, б – в эффекторной стадии. 1 – стадия индукции реакции, 2 – эффекторная стадия, ОА – овальбумин, СЭ – синий Эванса, LLC – карцинома легкого Льюиса

на экспрессию I-A-a. Согласно данным литературы к увеличивающим экспрессию агентам, кроме аспирина, относятся индометацин, интерферон λ , интерлейкины 2, 4, 6, антигены, адъюванты и т. д., а к подавляющим ее – интерфероны α и β , кортикостероиды,

ультрафиолетовое и рентгеновское облучение, фактор некроза опухоли, моноклональные антитела, серотонин, нейраминидаза, простагландин E_2 и многие другие [7–9, 13–15]. Это ничтожная доля от общего числа средств, способных модулировать экспрессию

Таблица 1. Влияние аспирина и никотинамида на интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа к овальбумину на разных ее стадиях

Группа	Стадия индукции		Эффекторная стадия		Индекс реакции, %
	Вводимые препараты	Способ введения	Вводимые препараты	Способ введения	
1	ОА, СЭ	Подкожно в холку	ОА	В подушечку задней лапы	18,9 ± 1,4
2	ОА, СЭ, аспирин	«—»	ОА	«—»	35,5 ± 0,7*
3	СЭ, аспирин	«—»	ОА	«—»	3,2 ± 1,6
4	ОА, СЭ	«—»	ОА, аспирин	«—»	7,7 ± 1,5**
5	СЭ	«—»	ОА, аспирин	«—»	3,5 ± 2,4
6	ОА, СЭ, НА	«—»	ОА	«—»	6,4 ± 2,2*
7	СЭ, НА	«—»	ОА	«—»	2,9 ± 0,8
8	ОА, СЭ	«—»	ОА, НА	«—»	30,6 ± 2,3*
9	СЭ	«—»	ОА, НА	«—»	2,5 ± 2,3

Примечание. ОА — овальбумин, СЭ — синий Эванса, НА — никотинамид. Группа 1 — положительный контроль: реакция гиперчувствительности замедленного типа без введения аспирина или никотинамида; группы 3, 5, 7, 9 — отрицательный контроль (пояснение в тексте). Достоверность различий по сравнению с контрольными показателями: * $p < 0,001$, ** $p < 0,02$.

Таблица 2. Противоопухолевая активность интратуморально индуцированной реакции гиперчувствительности замедленного типа к овальбумину (гиперчувствительность замедленного типа стимулирована 2 способами: аспирином в стадии индукции и никотинамидом в эффекторной стадии)

Группа	Стадия индукции			Эффекторная стадия			ТРО, %	УПЖ, %
	Вводимые препараты	Способ введения	Дни введения с начала иммунотерапии	Вводимые препараты	Способ введения	Дни введения с начала иммунотерапии		
1	—	—	—	—	—	—	—	—
2	ОА, СЭ, аспирин	Подкожно в холку	1, 7, 10-й	ОА	Интратуморально	5, 11, 14-й	81,5 ± 4,6*	31
3	ОА, СЭ	«—»	«—»	ОА НА	«—»	«—»	86,5 ± 2,2 *	27
4	СЭ, аспирин	«—»	«—»	—	—	—	15,5 ± 3,0**	4
5	СЭ	«—»	«—»	НА	«—»	«—»	+7,2 ± 3,1***	0

Примечание. *ТРО — торможение роста опухоли, ОА — овальбумин, СЭ — синий Эванса, НА — никотинамид, УПЖ — увеличение продолжительности жизни. * $p < 0,05$ — достоверные отличия относительно группы 1 (нелеченой). ** $p < 0,05$ — достоверные отличия относительно группы 2, *** $p < 0,05$ — достоверные отличия относительно группы 3; «+» — означает прирост опухоли в группе 5.

антигенов II класса МНС. Такие препараты при неправильном их применении могут оказаться опасными для больных.

В представленной работе достигнут высокий уровень торможения роста опухоли с помощью ГЗТ даже к такому слабому антигену, как ОА. Предложенный способ иммунотерапии рассматривается как начальный этап разработки адекватной схемы лечения. В дальнейших исследованиях потребуются замена ОА на вакцины (к примеру, бациллу Кальметта — Герена) или на опухолеспецифические антигены.

Заключение

Сведения о разнонаправленном механизме регуляции ГЗТ I-A-молекулами имеют большое значение. Данный механизм универсален, предсказуем, и с его помощью 2 способами можно как повысить уровень реакции, например в противоопухолевом иммунитете, так и подавить его на разных стадиях, как это требуется при других патологиях, например в трансплантологии, ожоговой болезни, кардиологии, при заболеваниях, связанных с воспалением, и др.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Ben-Neriah Y., Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the mathh-maker. *Nature immunol* 2011;12(8):715–23. DOI: 10.1038/ni. 2060. PMID: 21772280.
2. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436–44. DOI: 10.1038/nature07205. PMID: 18650914.
3. Paik K.Y., Lee I.K., Lee Y.S. et al. Clinical implications of systemic inflammatory response markers as independent prognostic factors in colorectal cancer patients. *Cancer Res Treat* 2014;46(1):65–73. DOI: 10.4143/crt. 2014.46.1.65. PMID: 24520225. PMCID: PMC3918529.
4. Sica A. Role of tumor-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol* 2010;32(3):153–8. PMID: 21403610.
5. Yu H., Pardoll D., Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(11):798–809. DOI: 10.1038/nrc2734. PMID: 19851315. PMCID: PMC4856025.
6. Карасева В.И. Разнонаправленный контроль I-A-молекулами, экспрессированными антигенпрезентирующими клетками, реакции гиперчувствительности замедленного типа к овалбумину. *Иммунология* 1997;6:21–3.
7. Медуницын Н.В., Алексеев Л.П. Система I-a-антигенов. М.: Медицина. 1987.
8. Hiromatsu Y., Sato M., Yamada K., Nonaka K. Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion(ICAM-1) and HLA-DR antigen expression on culture human endothelial cells. *Immunol Lett* 1991;31:35–40. PMID: 1347751.
9. Mochizuki M., Zigler J.S., Russell P. and Gery I. Cytostatic and cytolytic activities of macrophages. Regulation by Prostaglandins. *Cell Immunol* 1984;83(1):34–42. PMID: 6581870.
10. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;1:58–61.
11. Подоплелов И.И., Крылов О.Р., Медуницын Н.В. Эванс синий как адъювант для получения повышенной чувствительности замедленного типа в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1985;6:729.
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под. ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005:637–674.
13. Heagy W., Kelley V.E., Strom T.B. et al. Decreased expression of human class II antigens on monocytes from patients with acquired immune deficiency syndrome. Increased expression with interferon-gamma. *J Clin Invest* 1984;74(6):2089–96. DOI: 10.1172/JCI111633. PMID: 6439741. PMCID: PMC425399.
14. Stingl L.A., Sauder D.N., Iijima M. et al. Mechanism of UV-beta-induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells. *J Immunol* 1983;130(4):1586–91. PMID: 6187815.
15. Наумов Ю.Н., Коненков В.И., Алексеев Л.П. Регуляция экспрессии генов гистосовместимости II класса. *Иммунология* 1993;2:6–11.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОДКОЖНОГО КСЕНОГРАФТА МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА MEL CHER С МУТАЦИЕЙ V600E BRAF НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ

Н.В. Андропова, Л.Ф. Морозова, И.Н. Михайлова, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова,
Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Ю.А. Борисова, С.М. Ситдикова, Е.М. Трешалина

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. Разработка новых моделей диссеминированной меланомы кожи человека с молекулярно-генетической мишенью для таргетной терапии повышает результативность доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* новых антимеланомных средств и их комбинаций. Такая возможность реализована путем адаптации к росту *in vivo* оригинальной линии клеток пигментированной меланомы кожи человека *mel Cher* и получения подкожного (п/к) ксенографта под контролем трансплантационных, морфологических, молекулярно-генетических (мутация V600E BRAF) и химиотерапевтических (чувствительность к ингибитору BRAF-киназы вемурафенибу) характеристик.

Цель исследования — получение из линии клеток *mel Cher* п/к ксенографта пигментированной меланомы кожи человека с мутацией V600E BRAF, чувствительной к специфической таргетной терапии.

Материалы и методы. Использованы линия клеток пигментированной меланомы кожи человека *mel Cher* из коллекции ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (РОНЦ) и иммунодефицитные мыши-самки Balb/c nude разведения РОНЦ. Искомые характеристики определены при многократном п/к трансплантировании *in vivo* с помощью методов трансплантационной биологии, световой микроскопии, молекулярной генетики и экспериментальной химиотерапии. Чувствительность к ингибитору BRAF-киназы вемурафенибу оценена под контролем скорости роста опухоли (V/V_0) по адекватным для пациентов показателям: наличие полной ремиссии и возможность рецидива.

Результаты. При п/к трансплантации 10^7 клеток линии *mel Cher* получены цитологически идентичные перевиваемые п/к ксенографты с устойчивой кинетикой роста на 4–9-м пассажах (латентная фаза 8 дней, экспоненциальная — до 14, стационарная — до 24) и наличием мутации V600E BRAF. Вемурафениб в разовой дозе 75 мг/кг вызвал полную ремиссию в течение 15-дневного курса и в течение 7 дней после его отмены, с последующим рецидивом.

Заключение. Полученный из линии клеток пигментированной меланомы кожи человека *mel Cher* чувствительный к вемурафенибу п/к ксенографт с мутацией V600E BRAF пригоден для доклинического изучения направленных на эту мишень новых противомеланомных средств.

Ключевые слова: пигментированная меланома кожи человека, мутация V600E BRAF, подкожный ксенографт, иммунодефицитная мышь

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-65-71

MODELING OF A SUBCUTANEOUS XENOGRAFT OF HUMAN SKIN MELANOMA MEL CHER WITH V600E BRAF MUTATION IN IMMUNODEFICIENT MICE FOR PRECLINICAL STUDY THE TARGETING ANTICANCER DRUGS

N. V. Andronova, L. F. Morozova, I. N. Mikhailova, A. A. Lushnikova, D. A. Ponkratova, N. T. Raychlin,
I. A. Bukaeva, U. A. Borisova, S. M. Sitdikova, H. M. Treshalina

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. Development of new models of a human disseminated skin melanoma of the with molecular-genetic targets for specific therapy increases productivity of the preclinical researches new the anti-melanoma drugs or their combinations *in vitro* and *in vivo*. Such opportunity is realized by adaptation *in vivo* of the original human pigmented skin melanoma cell line *mel Cher* and receiving subcutaneous (s. c.) xenograft under monitoring of transplant, morphological, molecular-genetic (V600E BRAF mutation) and chemotherapeutic (sensitivity for the inhibitor of BRAF kinases to a vemurafenib) characteristics.

Objective: receiving from the cell line mel Cher s. c. xenograft of the human pigmented skin melanoma with V600E BRAF mutation and sensitive to specific target therapy.

Materials and methods. Human pigmented skin melanoma cell line mel Cher from the Collection of Russian Cancer Research Center and immunodeficient Balb/c nude female mice cultivated in Russian Cancer Research Center was used. Required characteristics are defined by multiple s. c. transplanting in vivo by methods of transplant biology, a light microscopy, molecular-genetics and the experimental chemotherapy. Sensitivity to a BRAF kinase inhibitor to a vemurafenib was estimated under monitoring of the tumor growth rate (V_t/V_0) on indexes, adequate for patients: existence of the complete remission and possibility of recurrence.

Results. When s. c. transplantation of 107 cell of mel Cher line cytological identical intertwined s. c. xenografts with a stable growth kinetics on 4–9 passages (a latent phase 8 days, exponential — to 14 days, stationary — to 24 days) and existence of a mutation of V600E BRAF have been received. Vemurafenib in a single dose of 75 mg/kg caused the complete remission during a 15-day course and within 7 days after its cancellation — with the subsequent recurrence.

Conclusion: receiving from the cell line mel Cher s. c. xenograft of a human pigmented melanoma of skin with a mutation of V600E BRAF and sensitive to specific target therapy is suitable for preclinical studying of the new anti-melanoma drugs specific for this target.

Key words: human pigmented skin melanoma, V600E BRAF mutation, subcutaneous xenograft, immunodeficient mice

Введение

Меланома кожи человека — гетерогенное по фенотипу и молекулярно-генетическим характеристикам заболевание, диссеминированная форма которого отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к различным видам терапии [1, 2].

С учетом успехов таргетной терапии диссеминированного процесса приоритетом при создании моделей меланомы на животных остается прогрессия опухоли, развивающейся при наличии мутаций в генах, дефектные продукты которых нарушают клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Клиническая значимость для антимеланомной терапии доказана для мутации V600E в 15-м экзоне гена *BRAF*, приводящей к гиперактивации серинтреониновой *BRAF*-киназы с последующей аномальной пролиферацией клеток и быстрой прогрессией опухоли [3–6].

Для избирательного блокирования *BRAF*-киназы создан ряд антимеланомных таргетных препаратов, наиболее эффективным из которых при лечении диссеминированной меланомы в клинике и на различных экспериментальных моделях является производное 7-азаиндола вемурафениб (PLX4032, *zelboraf*[™], *зельбораф*) [3, 7, 8]. Соответственно наличие доклинической меланомной модели с мутацией V600E *BRAF*, чувствительной к вемурафенибу, открывает возможность подготовки для клинической апробации новых таргетных антимеланомных лекарственных средств.

Модели *in vivo* для изучения антимеланомных таргетных препаратов представлены подкожными (п/к) ксенографтами, полученными из клеток метастатической меланомы кожи человека и имеющими специфическую мишень [9]. В Коллекции ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) есть оригинальная клеточная линия меланомы кожи человека mel Cher (№ 704Д в РККК (П)), полученная

из удаленного метастатического лимфатического узла пациентки, цитологически полиморфная, со стабильными культуральными, морфологическими и индивидуальными фенотипическими характеристиками (раково-тестикулярный антиген MAGE-3, дифференцировочные антигены CD63, HMW, HMB45 и Tyrosinase, молекулы гистосовместимости 1-го и 2-го класса) [10, 11]. В рамках этой работы в клетках mel Cher выявлена мутация V600E *BRAF* [5].

Цель исследования — получение подкожных ксенографтов меланомы кожи человека с мутацией V600E *BRAF* у иммунодефицитных мышей Balb/c nude в качестве доклинической модели.

Задачи исследования:

определение мутации V600E в 15-м экзоне гена *BRAF* в клетках mel Cher и в срезах п/к ксенографтов mel Cher;

- адаптация клеточной линии mel Cher к росту *in vivo* под контролем прививаемости и стабильной кинетики;
- оценка лекарственной чувствительности к вемурафенибу п/к ксенографтов mel Cher.

Материалы и методы

Мутацию V600E в 15-м экзоне *BRAF* определяли в клетках линии mel Cher и в стабильных пассажах п/к ксенографтов 4-го и 9-го пассажей на пике экспоненциальной фазы роста. При выделении ДНК фрагменты опухолевой ткани объемом ~1 см³ гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, 4 mM NaCl, pH = 8,0, и 200 мкл гомогената переносили в пластиковую пробирку объемом 2 см³. Затем вносили протеиназу К («Сиб-Энзим», Россия) до концентрации 50 мкг/мл и SDS до 0,5 %, образец тщательно перемешивали. Содержимое пробирки инкубировали в течение 2 ч при 37 °C. Объем образца доводили до 5 мл стандартным буфером TE, pH 8,0 и последовательно экстрагировали ДНК

равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ (24: 1) и хлороформом. К образцу добавляли 1/10 объема 5 М ацетата натрия, pH 5,3, перемешивали и осаждали ДНК путем добавления 2,5 объема охлажденного 96 % этанола, затем оставляли образец на 30 мин при -20°C . Пробирку центрифугировали 15 мин при 0°C с ускорением 12000 g. Осадок ДНК высушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл буфера TE, pH 8,0. Хранили раствор ДНК при -20°C . Для поиска соматических мутаций в 15-м экзоне гена BRAF использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами *BRAF_Ex15BR – For* и *BRAF_Ex15BR_Rev*, температура отжига праймеров 56°C :

BRAF_Ex15BR – For 5'-CTACTGTTTTCCTTTA CTTACTACAC-3'

BRAF_Ex15BR_Rev 5'-ATCCAGACAAGTGTTC AAAGTGATG-3'.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси по известной схеме [11]. Полосу, соответствующую последовательности 15-го экзона гена *BRAF* длиной 173 п. н., вырезали из геля и выделяли ДНК с помощью набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System (Promega, США). Образец ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) по протоколам фирмы-производителя в режиме фрагментного анализа. Для оценки результатов ПЦР-анализа использовали компьютерные программы Chromas или GeneMapper.

Для получения п/к ксенографтов использованы 120 половозрелых 6–8- недельных иммунодефицитных мышей обоего пола Balb/c nude конвенционального содержания [12]. Контролем адаптации *in vivo* и получения стабильных п/к ксенографтов меланомы кожи человека линии mel Cher служили следующие характеристики:

наличие мутации V600E BRAF в клетках линии mel Cher;

- оптимальная прививочная доза клеток, дающая п/к ксенографты у 100 % мышей в группе;
- цитологическая идентичность клеточной линии и п/к ксенографта;
- устойчивая многократная трансплантация (до 9-го пассажа) п/к ксенографта взвесью опухолевой ткани;
- устойчивая кинетика роста п/к ксенографтов;
- гистологическая верификация меланомы кожи человека в п/к ксенографтах;
- наличие мутации V600E BRAF в п/к ксенографтах;
- высокая чувствительность п/к ксенографтов к вемурафенибу.

Инокулятом для имплантации служила культивированная в атмосфере с CO_2 клеточная линия меланомы кожи человека mel Cher из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина [11]. Отмытые физиологическим

раствором от культуральной среды клетки (нулевой пассаж) помещали в питательную среду 199 и имплантировали с использованием стандартной техники перевивки подкожно в дозах $0,6 \times 10^7$; $0,8 \times 10^7$; $1,0 \times 10^7$ клеток на 1 мышь ($n = 4$) в 0,2 мл питательной среды [13]. Все манипуляции с имплантацией клеток опухоли человека выполняли под ламинаром (*Lamsystems LS 240.120.00*, Россия) с соблюдением соответствующей асептики и антисептики. Контроль прививаемости клеток осуществляли по наличию пальпируемых опухолей у мышей.

Повторную трансплантацию (1–9-й пассажи) выполняли взвесью опухолевой ткани предшествующих пассажей, которую инокулировали мышам ($n = 4$) по 50 мг в разведении 1: 20 питательной средой 199. О кинетике роста п/к ксенографтов судили по результатам измерения в течение 2–4 нед каждые 3–4 дня с помощью электронного штангенциркуля. Период более чем 2-кратного увеличения среднего объема опухоли ($V_{\text{ср}} = a \times b \times c$) определял длительность экспоненциальной фазы роста, а стабилизация роста опухоли на уровне менее 2-кратного увеличения – длительность стационарной фазы роста. Кратность прироста опухоли рассчитывали по соотношению последующего среднего объема к предыдущему (V_i/V_{i-1}). Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли 2 смежных пассажей в полулогарифмической системе координат подтверждало устойчивость кинетических характеристик п/к ксенографтов меланомы кожи человека mel Cher у мышей Balb/c nude.

Цитологическую и гистологическую верификацию п/к ксенографтов для сравнения клеточного состава с исходной клеточной линией меланомы кожи человека mel Cher выполняли стандартно в 9-м пассаже с устойчивой кинетикой роста с помощью световой микроскопии («Поливар», Австрия) срезов опухоли, окрашенных гематоксилином и эозином. Контроль содержания меланина в культуре клеток и опухолевых узлах выполнен визуально по черной или темно-коричневой окраске образца с цито- и гистологическим подтверждением.

Вемурафениб (зельбораф, Rocher, Германия) вводили мышам ($n = 10$) с пальпируемыми п/к ксенографтами меланомы человека mel Cher в эффективной разовой дозе 75 мг/кг ежедневно в желудок на 4–19-е сут после трансплантации [13]. Контроль роста опухоли в динамике осуществляли в этой группе и в равночисленной группе без специфического лечения до начала (нулевые сутки) и 5-кратно после окончания курса вплоть до 31-го дня роста опухоли. Статистический анализ параметров роста п/к ксенографтов во всех случаях проведен с помощью стандартного метода Фишера. Исследования на животных с опухолями выполнены в соответствии с рекомендациями [14].

Таблица 1. Показатели роста меланомных узлов (нулевой пассаж) под кожей бока мышей-самок Balb/c nude после имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток линии пигментированной меланомы кожи человека mel Cher

Номер мыши	Средний объем меланомных узлов после имплантации клеток mel Cher, мм ³				
	на 10-е сутки	на 13-е сутки	на 17-е сутки	на 21-е сутки	на 24-е сутки
1	48	80	108	72	104
2	45	45	96	96	84
3	42	60	150	150	144
4	45	70	80	126	165
5	30	72	31,5	84	160
6	45	70	135	168	105
7	30	60	120	122	150
8	36	48	150	120	132
9	45	80	150	72	126
10	56	70	100	84	160
11	18	80	125	60	-
12	30	45	87,5	90	-
V_{cp} со стандартным отклонением	$39,0 \pm 10,5$	$65,0 \pm 13,3$	$111,0 \pm 35,1$	$104,0 \pm 33,4$	$133,0 \pm 27,8$
V_t/V_{t-1}	1,0	1,7	1,7	0,9	1,3

Результаты

Показано, что имплантация клеток меланомы линии mel Cher (нулевой пассаж) приводит к появлению солидных пальпируемых окрашенных в темно-коричневый цвет опухолевых узлов под кожей бока 100 % мышей-самок Balb/c nude только после прививочной дозы $1,0 \times 10^7$. На 10-й день роста (латентная фаза) $V_{cp} = 39,0 \pm 10,5$ мм³. Затем опухоли росли медленно без существенной динамики и экспоненциального роста, достигая к 24-м суткам $V_{cp} = 133,0 \pm 27,8$ мм³. Кратность еженедельного прироста опухоли менее 2: $V_t/V_{t-1} = 1,7 - 0,9 - 1,3$ (табл. 1, рис. 1).

На 4-м пассаже кинетика роста опухолей прогрессивно изменялась: латентная фаза сократилась до 8 дней, появилась экспоненциальная фаза длительностью до 14 дней, а к 21-м суткам $V_{cp} = 1526,3 \pm 496,0$ мм³, что в 10 раз превысило размеры нулевого пассажа. Достигнутая кинетика роста опухоли устойчиво сохранялась до 9-го пассажа со стабильными временными характеристиками. Прослеженная до окончания наблюдения кинетика роста mel Cher под кожей мышей при трансплантации 50 мг взвеси на мышь прогрессивно менялась после 4-го пассажа параллельно нарастанию пигментации до черного цвета. От 4-го до 9-го пассажа: латентная фаза составляла 8 дней с выходом опухолей на уровне $V_{cp} = 61 \pm 25$ мм³; экспоненциальная фаза длилась 6 дней (до 14-х суток) с пиком на 11-е сутки на уровне $V_{cp} = 182 \pm 67$ мм³,

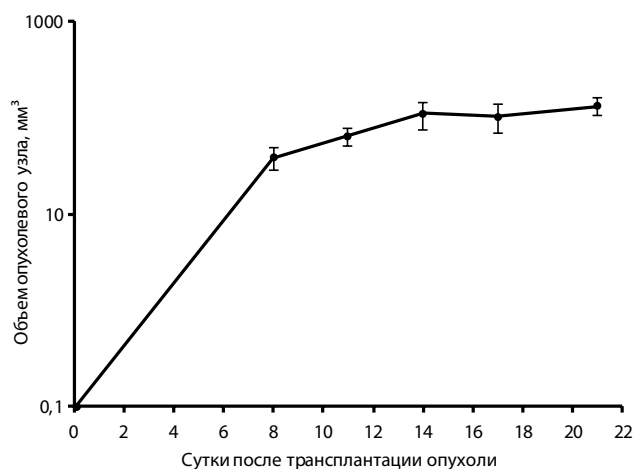


Рис. 1. Кинетика роста меланомных узлов (нулевой пассаж) под кожей бока мышей-самок Balb/c nude после имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток линии пигментированной меланомы кожи человека mel Cher

$V_t/V_{t-1} = 2,9$; стационарная фаза продолжалась 10 дней на уровне $V_{cp} = 1379 \pm 496$ мм³ (до 24-х суток), колебания $V_t/V_{t-1} = 1,9 - 2,1 - 1,8$ (табл. 2, рис. 2).

Цитологически клеточный состав п/к ксенографтов 9-го пассажа идентичен исходной линии клеток пигментированной меланомы кожи человека mel Cher. Видно, что клеточный состав полиморфный и представлен клетками разных размеров и формы: вытянутой, удлиненной, отростчатой, веретенообразной с тонкими длинными отростками разной длины,

Таблица 2. Показатели роста меланомных узлов под кожей мышей-самок Balb/c nude после трансплантации 50 мг взвеси меланомы кожи человека mel Cher (4-й и 9-й пассажи)

Номер мыши	Средний объем меланомных узлов после трансплантации, мм³					Пигментация +/–
	на 8-е сутки	на 11-е сутки	на 14-е сутки	на 17-е сутки	на 21-е сутки	
4-й пассаж						
1	80	215	650	840	1989	+
2	100	280	480	1092	2160	+
3	96	260	420	1530	2002	+
4	40	350	468	1200	1430	+
5	40	165	336	924	1950	+
6	40	140	280	800	1358	+
7	81	176	392	720	950	+
8	96	180	336	560	976	+
9	35	112	231	616	1638	+
10	72	126	252	420	810	+
11	42	128	312	297	1140	+
12	40	140	343	576	1260	+
13	40	140	245	-	-	+
14	45	168	294	616	990	+
15	70	156	245	504	648	+
V _{ср} со стандартным отклонением	61 ± 25	182 ± 67	352 ± 114	763 ± 333	1379 ± 496	
V _t /V _{t-1}	1,0	2,9	1,9	2,1	1,8	
9-й пассаж						
1	48	144	216	391	533	+
2	40	126	216	364	520	+
3	162	600	750	976	1260	+
4	144	700	810	1137	1920	+
5	118	364	795	876	890	+
6	93	256	375	568	954	+
7	79	196	275	369	732	+
8	129	463	697	579	1168	+
9	133	375	578	965	1053	+
10	65	578	456	890	904	+
V _{ср} со стандартным отклонением	101,1 ± 13,4	380,2 ± 63,1	516,8 ± 65,3	711,5 ± 62,3	993,4 ± 154,0	
V _t /V _{t-1}	1,0	3,8	1,4	1,4	1,4	

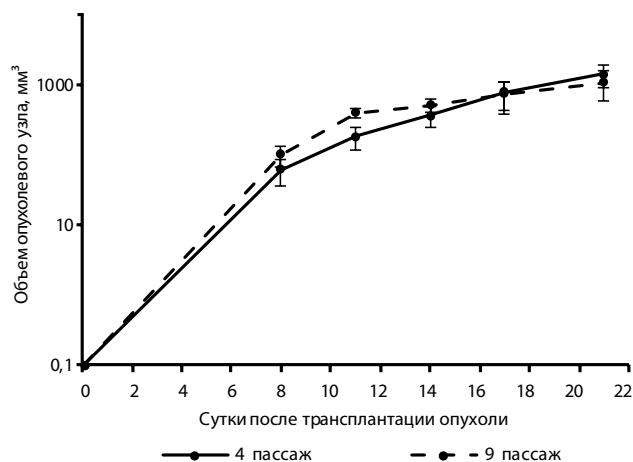


Рис. 2. Устойчивая кинетика роста опухолевых узлов пигментированной меланомы кожи человека mel Cher под кожей половозрелых мышей-самок Balb/c nude при многократном пассировании

округлой, овальной и неправильной формы. Цитоплазма клеток относительно обильная, неомогенная, окрашена в базофильные тона разной степени интенсивности, иногда с розоватым оттенком, и часто содержит значительное количество мелкозернистого пигмента меланина. Ядра опухолевых клеток полиморфные, нормо- и гиперхромные с 1–3 ядрышками. Строение хроматина мелкозернистое или мелкоглыбчатое. В части клеток отмечаются почкование и фрагментация ядер. Много уродливых гигантских многоядерных клеток округлой, вытянутой, удлинённой, отростчатой и неправильной формы с центральным или периферическим расположением ядер. Встречаются также гигантские 1-ядерные и 2-ядерные клетки. Часто выявляются митозы (рис. 3).

Данные трансплантационных исследований с патоморфологическим контролем позволяют считать завершённым процесс получения модели пигментированной меланомы кожи человека mel Cher в виде

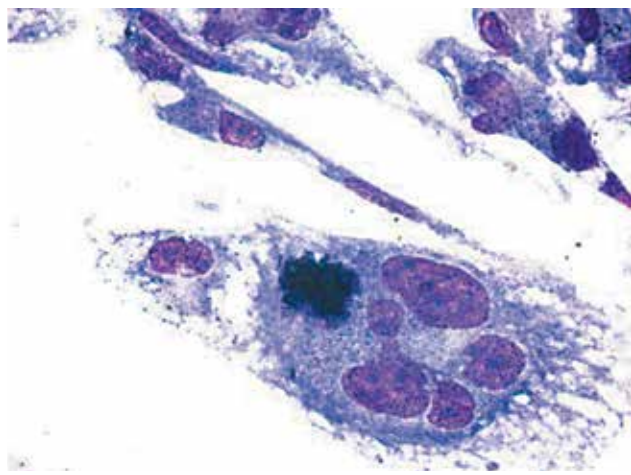


Рис. 3. Клеточный состав пигментированной меланомы кожи человека mel Cher (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$)

п/к ксенографтов у иммунодефицитных мышей-самок Balb/c nude.

В образце опухолевого узла меланомы кожи человека mel Cher 9-го пассажа на пике экспоненциальной фазы роста выявлена мутация V600E BRAF.

Результат секвенирования ПЦР-продукта с мутацией V600E BRAF в ДНК, выделенной из клеток п/к узла mel Cher, показан на рис. 4 и 5.

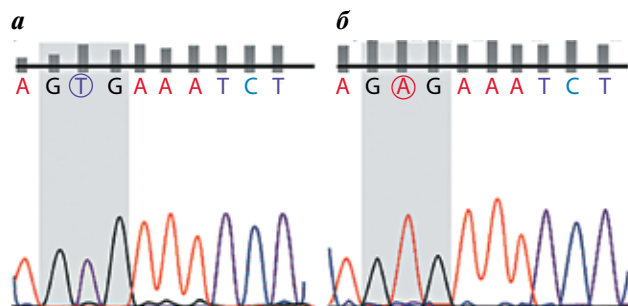


Рис. 4. Схема анализа мутации V600E BRAF в подкожных ксенографтах меланомы кожи человека mel Cher 9-го пассажа у мышей Balb/c nude: (a) — дикий тип, (b) — мутация с. 1799T > A, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 (V600E), триплет GTG → GAG выделен полосой

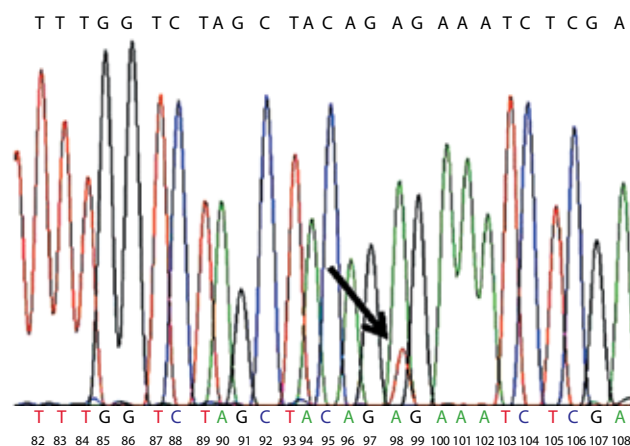


Рис. 5. Сиквенс 15-го экзона гена BRAF, ДНК из клеток подкожных ксенографтов меланомы кожи человека mel Cher 9-го пассажа у мышей Balb/c nude, мутация 1799T > A (GTG → GAG) выделена стрелкой

Полученные нами п/к ксенографты оказались высокочувствительными к таргетной терапии вемурафенибом. При длительной пероральной терапии на фоне непрерывного прогрессивного увеличения объема опухолей в контроле вемурафениб на протяжении всего курса полностью ингибировал рост опухоли. После отмены препарата в течение 7 дней регистрировалась полная ремиссия, а затем наступил рецидив, скорость роста опухоли соответствовала контрольной кривой в период ранней экспоненты (рис. 6).

Данные молекулярно-генетического и химиотерапевтического исследований позволяют считать модель mel Cher в виде п/к ксенографтов у иммунодефицитных

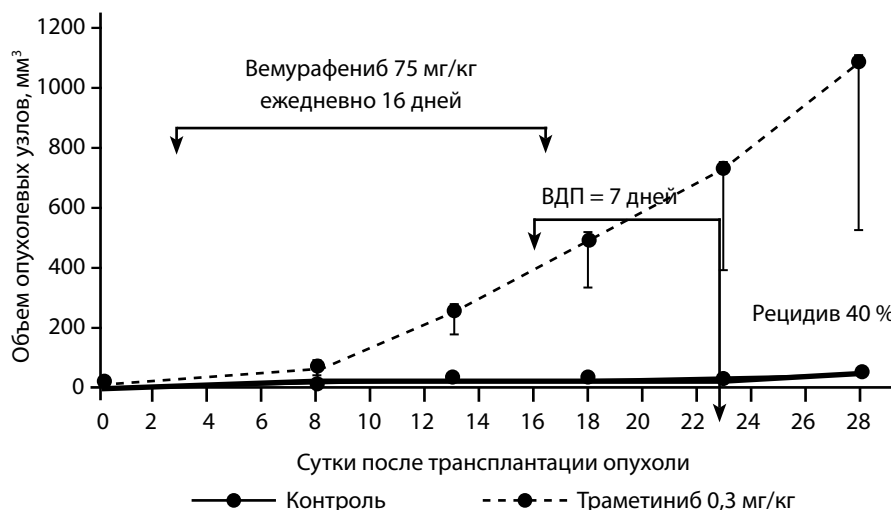


Рис. 6. Чувствительность подкожных ксенографтов меланомы кожи человека *mel Cher* к лечению ингибитором BRAF-киназы вемурафенибом, ВДП — время до прогрессирования.

мышей Balb/c nude новым штаммом пигментированной меланомы кожи человека, чувствительной к ингибиторам BRAF-киназы.

Заключение

В результате адаптации к росту под кожей иммунодефицитных мышей-самок Balb/c nude клеточной линии пигментированной меланомы кожи человека с мутацией V600E BRAF, *mel Cher* с определенной проспективно мутацией V600E BRAF получена новая перевиваемая модель меланомы *in vivo* в виде п/к ксенографтов.

Основные характеристики ксенографта: идентичность клеточного состава линии *mel Cher*, устойчивая кинетика роста на 4–9-м пассажах (латентная фаза 8 дней, экспоненциальная — до 14, стационарная — до 24), наличие мутации V600E BRAF.

Показана чувствительность п/к ксенографтов *mel Cher* к таргетной терапии вемурафенибом (зельборафом) с достижением 7-дневной полной ремиссии и рецидивирующим течением.

Модель предложена для доклинического изучения соответствующих указанной мишени таргетных противомеланомных средств.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вишневская Я.В., Машенкина Я.А., Сендерович А.И. и др. Современная морфологическая, иммуногистохимическая и молекулярно-генетическая диагностика меланомы кожи. Сибирский онкологический журнал 2012;4(52): 74–5.
2. Демидов Л.В., Орлова К.В. Индивидуализация лекарственного лечения меланомы кожи. Практическая онкология 2013;14(4):239–46.
3. Bollag G., Hirth P., Tsai J. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. Nature 2010;467:596–9.
4. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med 2010;363:809–19.
5. Joseph E.W., Pratilas C.A., Poulikakos P.I. et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(33):14903–8.
6. Tsai J., Lee J.T., Wang W. et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:3041–6.
7. Benlloch S., Paya A., Alenda C. et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. J Mol Diagn 2006;8:540–3.
8. Ribas A., Kim K.B., Schuchter L.M. et al. BRIM-2: an open label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation positive melanoma. J Clin Oncol 2011; 29(15 Suppl):8509.
9. Walker G.J., Soyer H.P., Terzian T., Box N.F. Modelling melanoma in mice. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24:1158–76.
10. Михайлова И.М., Барышников А.Ю. Коллекция клеточных линий меланомы человека. Издательство НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 2016:107.
11. Патент РФ № 2364624. Клеточная линия меланомы человека *mel Cher*, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Бурова О.С., Морозова Л.Ф. 2009.
12. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М., 2010.
13. Патент РФ № 2572569. Способ получения подкожных ксенографтов клеточной линии меланомы кожи человека *mel Cher* с мутацией V600E BRAF для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. 2015.
14. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Гарин А.М. Доклиническое изучение противоопухолевых препаратов. В кн.: Рациональная фармакотерапия в онкологии. М.: Litterra, 2015. С. 75–82.

СОЗДАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЭПИРУБИЦИНА

О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, З.С. Шпрах, М.П. Киселева, Л.М. Борисова,
М.В. Дмитриева, Ю.В. Родионова, С.В. Копачевская, Т.Ю. Еськина, **З.С. Смирнова**

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва,
Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Львовна Орлова orlovaol@mail.ru

Введение. Правительства разных стран стремятся снизить быстро растущие расходы на здравоохранение. Использование качественных и чаще всего более дешевых, чем оригинальные бренды, препаратов-дженериков существенно сокращает затраты и одновременно обеспечивает надлежащее качество лечения. Поэтому разработка препаратов-дженериков является актуальной задачей.

Цель исследования — воспроизводство лекарственной формы для создания отечественного препарата-дженерика эпирубицина. **Материалы и методы.** В исследованиях использованы субстанция эпирубицина Ph. Eur. действующего издания (Teva, Израиль), фармарибуцин (Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc., Италия/США) и вспомогательные вещества, соответствующие требованиям нормативной документации. Перевиваемая опухоль мышей: лимфоцитарная лейкемия P-388. Методы: технологические, фармако-аналитические, биологические и фармакологические.

Результаты. Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата-дженерика эпирубицин-РОНЦ® показал, что он по всем показателям качества совпадает с препаратом фармарибуцин. Результаты исследования острой токсичности на мышах и крысах и данные наблюдения за экспериментальными животными на протяжении 30 дней после однократного введения позволяют сделать вывод: оба препарата обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны. Воспроизведенный эпирубицин-РОНЦ® и фармарибуцин в лиофилизированной лекарственной форме для инъекций 10,0 мг во флаконе, вводимые однократно, проявляют равный противоопухолевый эффект при 2 путях введения на перевиваемой опухоли мышей — лимфоцитарной лейкемии P-388.

Выводы. В ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России воспроизведен препарат-дженерик — эпирубицин-РОНЦ®, который полностью соответствует импортному препарату.

Ключевые слова: дженерик, технология, токсичность, биологическая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-72-77

CREATING LABORATORY TECHNOLOGY OF GENERIC EPIRUBICIN PHARMECEUTICAL DOSAGE FORM

O.L. Orlova, A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, Z.S. Shprakh, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova,
M.V. Dmitrieva, Y.V. Rodionova, S.V. Kohachevskaya, T.Y. Eskina, **Z.S. Smirnova**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. Governments around the world seek to reduce rapidly rising health care costs. Using the same high quality and often cheaper than the original brands, generics greatly reduces costs while providing an adequate quality of care. Therefore the development of generic medicines is an important task.

The purpose of the study — the reproduction of the pharmaceutical dosage form for creation of national drug-generic epirubicin.

Materials and methods. The study used a substance epirubicin (Ph. Eur current edition, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Israel); “Farmorubicin”, production “Pfizer Italia Srl” for “Pfizer Inc.”, Italy / US and excipients conforming to with relevant regulatory documents. Mice transplanted tumor: lymphocytic leukemia P388. Methods: technological, pharmaco-analytical, biological and pharmacological.

Results. Pharmaceutical analysis of reproduced generic-drug “Epirubicin-RONC®” showed that it fully meets the requirements of manufacturer’s monograph. The results of “acute” toxicity study in rats and observations of the experimental animals within 30 days after a single administration suggest that both drugs have similar toxicological properties and are almost identical. Generic “Epirubicin RONC®” and “Farmorubicin” in lyophilized dosage form for injection 10.0 mg/vial, administered once, shows equal antitumor effect at two administration routes in mice with transplantable tumor: lymphocytic leukemia P-388.

Conclusion. N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia has been reproduced generic — “Epirubicin-RONC®”, which is fully conform to the imported drug.

Key words: generic, technology, toxicity, biological activity

Введение

Создание нового лекарственного средства — очень сложный и дорогостоящий процесс, затраты на который измеряются подчас сотнями миллионов долларов. Именно поэтому в мире сравнительно немногочисленных крупных фармацевтических компаний занимается разработкой новых лекарств; многие из них в последнее время объединяются, чтобы совместными усилиями обеспечить колоссальные расходы на поисковые исследования и внедрение. В среднем для создания нового препарата, от стадии разработки до стадии регистрации, требуется 12–15 лет. Изучаются как физико-химические, так и биологические свойства вещества (в том числе такие крайне важные показатели, как токсичность, мутагенность, канцерогенность и т. д.), затем начинается длительный процесс испытания и тестирования препарата на добровольцах, отслеживания побочных эффектов, вывода лекарства на рынок. Полученный в результате препарат называют оригинальным. В начале своего существования он защищен патентом. Патент и срок его действия обеспечивают фирме, создавшей препарат, право на эксклюзивное распространение без конкуренции со стороны других производителей, компенсацию затрат на разработку препарата, а также получение прибыли [1].

Если высокая эффективность и практическая ценность препарата подтверждены клиническими исследованиями и широкой клинической практикой, после окончания срока действия патента лекарство на законных основаниях может быть воспроизведено другими компаниями. Копия оригинального препарата называется дженериком [2]. Тенденция к широкому использованию высококачественных дженериков отчетливо прослеживается во всем мире, включая экономически развитые страны [3]. Правительства этих стран стремятся снизить быстро растущие расходы на здравоохранение. Использование качественных и чаще всего более дешевых, чем оригинальные бренды, препаратов-дженериков существенно сокращает затраты и одновременно обеспечивает надлежащее качество лечения [4]. На сегодняшний день доля дженериков на фармацевтическом рынке США и Канады составляет 30 % (в 1991 г. — 14 %). В Великобритании, Германии, Дании и Нидерландах доля дженериков достигает 50 %.

Поддержка производства дженериков, их использования в медицинской практике и замещения ими оригинальных препаратов является одной из стратегических целей Всемирной организации здравоохранения при обеспечении доступа к медицинской помощи.

Правительство России поставило цель к 2018 г. довести до 90 % долю лекарственных средств отечественного производства среди жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Под

эти цели созданы программы модернизации медицинской и фармацевтической отраслей, выполняющие важную задачу по импортозамещению. Также разработана федеральная целевая программа, предусматривающая совершенствование материальной базы этих отраслей в России. К 2020 г. правительство планирует решить ключевые вопросы отраслей и сделать отечественное производство главным поставщиком лекарственных средств на внутренний рынок. Регистрация воспроизведенных лекарственных средств проводится в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ [5].

За последние 60 лет в клинической онкологии появилось много новых химиотерапевтических препаратов, однако по-прежнему эпирубицин является важнейшим препаратом при лечении таких заболеваний, как рак молочной железы, рак яичников, немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, рак желудка и пищевода, первичный гепатоцеллюлярный рак, переходно-клеточный рак мочевого пузыря, саркома мягких тканей, остеосаркома, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, острый лейкоз, множественная миелома, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак головы и шеи [6].

Качество готовой лекарственной формы в первую очередь зависит от качества и особенностей физико-химических свойств фармацевтической субстанции. На основании первичных данных проработки технологии, включая изучение свойств эпирубицина, прогнозирование состава лекарственной формы и оценку рисков, проводили отработку состава на модельных образцах и разрабатывали первичные методы анализа. На основании данных литературы и по результатам апробации методов на модельных образцах оформили первичный проект фармакопейной статьи предприятия на готовый продукт.

Цель исследования — воспроизводство лекарственной формы для создания отечественного препарата-дженерика эпирубицина.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. Субстанция эпирубицина серии Р 3502/10 Ph. Eur. действующего издания (Teva, Израиль), фармэпирубицин производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc., Италия/США (ISO 9001:2015), вода для инъекций (ФС. 2.2.0019.15), натрия хлорид (ФС. 2.2.0014.15 или Ph. Eur. / USP действующих изданий), натрия гидроксид (Ph. Eur. / USP действующих изданий), метилпарагидроксibenзоат (Ph. Eur. / USP действующих изданий), лактоза безводная или лактоза моногидрат (Ph. Eur./USP действующих изданий), перевиваемая опухоль мышей — лимфоцитарная лейкемия Р-388.

Приборы и аппаратура. Установка двухступенчатого обратного осмоса УВОИ-М-Ф/1812 (НПК

«Медиана-Фильтр», Россия), фильтрующая система «Стерикап» с диаметром пор фильтра 0,22 мкм (Millipore, США), весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия), дозатор механический 0,5–10 мл (BIONIT, Финляндия), полуавтомат закаточный ПЗР-34-ВИПС-МЕД (ООО «Фирма «ВИРС-МЕД», Россия), установка для сублимационной сушки Edwards Minifast DO. 2 (Ero Electronic SpA, Италия), флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств из стекла I гидrolитического класса вместимостью 10 мл (10R) по ИСО 8362–1, резиновые пробки для сублимационной сушки по ИСО 8362–2, алюминиевые колпачки с пластмассовой вставкой по ИСО 8362–7.

Воспроизводство лиофилизата эпирубицина гидрохлорида 10 мг во флаконе. Предварительно готовили раствор метилпарагидроксibenзоата (парабен), в котором растворяли лактозу безводную. В полученном растворе вспомогательных веществ растворяли эпирубицина гидрохлорид. Измеряли pH полученного раствора эпирубицина гидрохлорида, который должен быть 4,5–6,5. Если pH был меньше 4,5, его корректировали с помощью 1М раствора гидроксида натрия (1–2 капли).

Стерилизующая фильтрация. Для стерилизации раствора в лабораторных условиях использовали фильтрацию под давлением через систему «Стерикап». Стерильный раствор контролировали на содержание эпирубицина гидрохлорида в 1 мл. Далее дозировали по 2 мл во флакон вместимостью 10 мл, предукпоривали пробками для сублимационной сушки и помещали в камеру сублимационной сушилки при 20–22 °С для замораживания и последующей лиофилизации.

Датчики вводили в контрольные флаконы и подключали к гнезду самопишущего регистрирующего прибора в сублимационной камере, дверь камеры плотно закрывали.

Определение криогидратной температуры раствора эпирубицина гидрохлорида. Первая фаза лиофилизации – замораживание является важной операцией, от правильности ее проведения зависит качество препарата. Выбор температуры замораживания и определение уровня самых низких температур высушивания в период сублимации зависят от эвтектической точки – криогидратной температуры вещества. Исследование криогидратной зоны раствора эпирубицина гидрохлорида проводили термометрическим методом.

Токсикологические исследования. Острую токсичность изучали на мышах и крысах (нелинейных самцах и самках) при однократном внутривенном введении препарата. Препараты вводили в возрастающих дозах. Дозы рассчитывали индивидуально для каждого животного, учитывая массу тела.

Субхроническую токсичность изучали на половозрелых крысах (нелинейных самцах и самках). Были выбраны 3 дозы (с учетом пересчета с человека на крысу): терапевтическая, деленная на количество введений 3–4,3 мг/кг, в 2 раза больше исходной и в 2 раза меньше исходной. Продолжительность наблюдения – 60 сут.

Дополнительно проведено изучение эффективности воспроизведенного препарата эпирубицин-РОНЦ® на базе лаборатории экспериментальной химиотерапии. Исследование выполняли на перевиваемой опухоли мышей Р-388. Штамм опухоли вели на мышах-самках линии DBA₂. В опыте использованы мыши-самки линии F₁ (C₅₇Bl₆ × DBA₂), полученные из питомника «Столбовая». Доклиническое изучение проводилось в соответствии с рекомендациями [7].

Результаты и обсуждение

Технологические исследования. Для определения криогидратной зоны использовали модельный раствор лекарственной формы эпирубицина. Состав препарата эпирубицин-РОНЦ® на 1 флакон был следующим: эпирубицин – 10,0 мг (в пересчете на 100 % вещество), метилпарагидроксibenзоат – 2,0 мг, лактоза безводная или лактоза моногидрат – 50,0 или 52,6 мг соответственно.

На кривой замораживания раствора эпирубицина показано, что начало кристаллизации происходит в области –12 °С, однако неярко выраженные зоны замораживания появляются и ниже этой отметки. (рис. 1).

Таким образом, температура эвтектики находится в диапазоне –12...–15 °С.

Замораживание и сублимационная сушка модели лекарственной формы эпирубицина. Для разработки экономически оправданного и научно обоснованного технологического процесса необходимо определить влияние режима замораживания и сушки на качество полученного продукта.

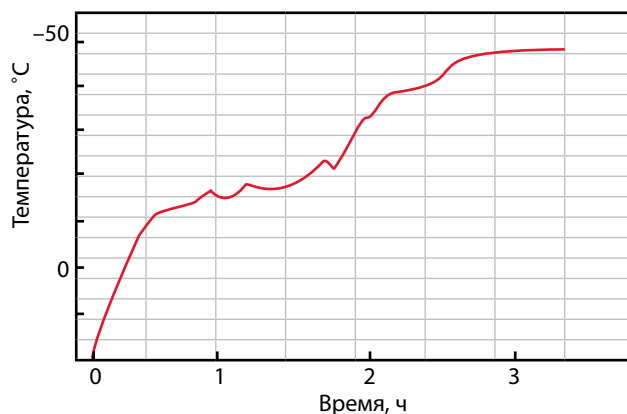


Рис. 1. Кривая замораживания раствора эпирубицина гидрохлорида

Продолжительность «закалки» (время замораживания) и скорость замораживания определяли непосредственно на полке сублимационной установки. Для этого 2 мл раствора эпирубицина гидрохлорида во флаконах вместимостью 10 мл помещали на полку (20 °С) и охлаждали полку до –45 °С. Время выравнивания температуры продукта и температуры полки составило 1,5–2 ч.

Затем препарат выдерживали при этой температуре в течение 2,5–3 ч (закалка) и включали вакуум (0,1–0,5 мм рт. ст.). Продолжительность закалки и температура полки в начале сублимации влияют на качество продукта. Так, малая продолжительность закалки при температурах –40 и –45 °С с последующей сушкой на полке с положительной температурой вызывает вспенивание продукта. Серии, выдержанные менее 3 ч при этих температурах замораживания, в процессе сублимации на полках с температурой от 0 до 8 °С вспенились. В то же время серии, выдержанные при –45 °С в течение 3 ч, не вспенились при сублимации на полке с температурой от 0 до 10 °С.

Анализируя скорости подогрева полки, заданные при сушке ряда лабораторных серий препарата, выбрали нагревание со скоростью 2–5 °С в час, при которой не происходит вспенивание продукта и в то же время увеличивается интенсивность сублимации.

В результате исследования установлен оптимальный режим сушки раствора эпирубицина гидрохлорида, дозированного по 2,0 мл во флаконах вместимостью 10 мл, замороженного на полке сублимационной установки. Изменение температуры продукта в зависимости от температуры полки представлено на графике сушки препарата, вакуум постоянный в пределах 0,01–0,05 мм рт. ст. (рис. 2).

Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата показал, что он полностью соответствует ISO импортного препарата – фармарубицина.

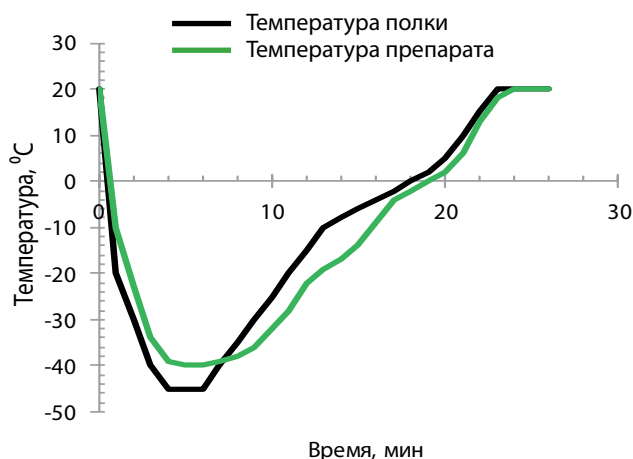


Рис. 2. Температура полки и препарата при лиофилизации раствора эпирубицина

Доклиническое исследование безопасности эпирубицина-РОНЦ® в сравнении с коммерческим препаратом фармарубицином производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. В соответствии с руководством [5] были проведены токсикологические испытания воспроизведенного препарата эпирубицин-РОНЦ®. Исследование острой токсичности эпирубицина-РОНЦ® проводилось относительно препарата сравнения — фармарубицина серии 1FN0018 производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

При изучении острой токсичности на мышах методом пробит-анализа были рассчитаны летальные и токсические дозы. Для обоих препаратов ЛД₅₀ для мышей равнялась 25 мг/кг. Смертность мышей при введении эпирубицина-РОНЦ® и фармарубицина была одинаковой. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Гибель животных в эксперименте при применении экспериментального и оригинального препаратов

Показатель	Эпирубицин-РОНЦ®			Фармарубицин		
Доза, мг/кг	30	15	8	30	15	8
Lg D	1,5	1,2	0,9	1,5	1,2	0,9
Пробит	5,33	4,19	0	5,33	4,19	0
Погибло, абс.	3	1	0	3	1	0
Погибло, %	60	20	0	60	20	0

При изучении острой токсичности на крысах все животные оставались живы на протяжении исследования.

При исследовании некропсийного материала сравниваемых групп не было установлено статистически значимых отличий массовых коэффициентов внутренних органов, динамики массы тела животных, макроскопических характеристик. Таким образом, результаты исследования и данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 30 дней после однократного введения позволяют сделать вывод о том, что оба препарата обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны.

При проведении исследования субхронической токсичности отмечена смертность части животных при введении препарата в дозе 8,6 мг/кг (суммарная доза 25,8 мг/кг). По интегральным показателям крысы отличались от контрольной группы (без введения препаратов). При введении эпирубицина-РОНЦ® и фармарубицина в дозах 4,3 и 2,2 мг/кг соответственно не было обнаружено никаких изменений со стороны внутренних органов и системы крови. Таким образом, можно сделать вывод: эпирубицин-РОНЦ® может вызвать некоторые системные токсические эффекты, типичные для противоопухолевых препаратов,

Таблица 2. Противоопухолевая активность воспроизведенной лекарственной формы эпирубицин-РОНЦ® в сравнении с фармарибуцином на перевиваемой опухоли мышей – лимфоцитарной лейкемии Р-388

№	Группа	Доза (мг/кг)/ интервал (ч) × число введений	Путь введения	СПЖ (дни)	УПЖ, %	Гибель от токсичности*
	Контроль	—	—	8,9	—	0/12
1	Эпирубицин – РОНЦ®	15 × 1	в/в	26,1	193	0/8
2		15 × 1	в/бр	20,8	134	0/8
3		4/24 × 5	в/бр	19,4	118	0/8
4	Фарма- рубицин	15 × 1	в/в	26,0	192	0/8
5		15 × 1	в/бр	22,9	157	0/8
6		4/24 × 5	в/бр	14,7	65	2/8

Примечание. СПЖ – средняя продолжительность жизни, УПЖ – увеличение продолжительности жизни, в/в – внутривенное введение, в/бр – внутрибрюшинное введение. *В табл. 1 показано, что доза эпирубицина 15 мг вызвала гибель 20 % здоровых животных, тогда как при изучении противоопухолевой активности эта доза не вызвала гибели животных. Возможная причина – использование разных линий мышей в экспериментах по изучению сравнительной токсичности и противоопухолевой активности препарата.

и не отличается по воздействию на организм от препарата сравнения фармарибуцина.

Сравнительное изучение противоопухолевой активности. При сравнительной оценке противоопухолевой активности эпирубицина-РОНЦ® и фармарибуцина показано, что продолжительность жизни мышей с лимфоцитарной лейкемией Р-388 при однократном внутривенном введении воспроизведенной лекарственной формы эпирубицин-РОНЦ® составляет в среднем 26,1 дня, а при внутрибрюшинном введении – 20,8 дня. Увеличение продолжительности жизни составляет 193 % при внутривенном введении и 134 % – при внутрибрюшинном введении. Эти результаты статистически не отличаются от эффективности коммерческой лиофилизированной лекарственной формы для внутривенных инъекций фармарибуцина (табл. 2).

Независимо от пути введения лекарственных форм эпирубицина в дозе 15 мг/кг при однократном введении препарата мыши линии F₁(C₅₇Bl₆ × DBA₂) с перевиваемой опухолью Р-388 проявляли одинаковую продолжительность жизни ($p > 0,05$).

Заключение

Разработана технология препарата-дженерика эпирубицин-РОНЦ®.

На основании проведенных исследований отобран оптимальный режим сушки раствора эпирубицина.

Проведенный фармацевтический анализ воспроизведенного препарата показал, что его качество полностью соответствует импортному препарату фармарибуцину производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

В результате изучения острой токсичности установлено, что препараты обладают сходными токсикологическими характеристиками и практически идентичны.

При проведении исследования субхронической токсичности показано, что эпирубицин-РОНЦ® может вызвать некоторые системные токсические эффекты, типичные для противоопухолевых препаратов, и не отличается по воздействию на организм от препарата сравнения фармарибуцина производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США).

При сравнительном исследовании противоопухолевой активности на перевиваемой опухоли мышей – лимфоцитарной лейкемии Р-388 показано, что воспроизведенный эпирубицин-РОНЦ® и фармарибуцин производства Pfizer Italia Srl для Pfizer Inc. (Италия/США) проявляют равный противоопухолевый эффект.

В настоящее время эпирубицин-РОНЦ® прошел государственную регистрацию в Минздраве России и выпускается филиалом «Наукапрофи» ФБГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Григорьев В.Ю. Дженерики и бренды в химиотерапии. Антибиотики и химиотерапия 2006;51(8):38–47.
2. Соколов А.В. Оригинальные препараты и дженерики: качество, возможные пути решения проблемы. Медицинские технологии. Оценка и выбор 2012;3(9):52–6.
3. Ишмухаметов А. Дженерики в Европе. Генерическая экспансия на фармрынке ЕС. Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике 2011;1:7–13.
4. Соколов А.В., Липатова В.С. Оригинальные препараты и дженерики: проблема выбора. Рецепт 2011;3:28–35.
5. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изм. и доп.). Глава 6. Осуществление государственной регистрации лекарственных препаратов.
6. Регистр лекарственных средств России® РЛС®. 2014–2015.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АНАЛОГА ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА

Е. В. Санарова¹, Си Чжан², М. В. Дмитриева¹, А. В. Ланцова¹, О. Л. Орлова¹, А. П. Полозкова¹,
Н. А. Оборотова^{1, 2}, И. И. Краснюк²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России;
Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

Контакты: Екатерина Викторовна Санарова sanarova8686@mail.ru

Введение. В связи с перспективностью применения в качестве лекарственного средства аналога гипоталамического гормона соматостатина (АГГС), синтезированного в лаборатории химического синтеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России и показавшего высокую противоопухолевую активность, возникает потребность в создании лекарственной формы и оптимальной технологии ее получения. В ходе предварительных исследований в качестве модели лекарственной формы для АГГС выбраны липосомы, технологический процесс получения которых имеет ряд специфических стадий.

Цель исследования — разработка технологии получения липосомальной лекарственной формы АГГС.

Материалы и методы. Липосомы АГГС получали методом Бенгема в модификации для гидрофобных субстанций. Для уменьшения диаметра липосом использовали методы экструзии, гомогенизации и обработки ультразвуком. Анализ размера липосом проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния с использованием наносайзера. Значение рН липосомальной дисперсии определяли методом потенциометрии. Количественное содержание лекарственного вещества измеряли методом спектрофотометрии с использованием стандартного образца при (282 ± 3) нм и спиртового раствора пустых липосом в качестве раствора сравнения. Количество включенного препарата рассчитывали как отношение концентрации лекарственного вещества в липосомальной дисперсии после фильтрации к его концентрации в дисперсии после получения.

Результаты и выводы. Гидрофобная природа субстанции АГГС обуславливает технологические особенности получения липосомальной лекарственной формы. Так, на стадии формирования липидной пленки субстанция растворяется в органическом растворителе вместе с липидами, а полученную липидную пленку гидратируют раствором криопротектора. Измельчение липосом АГГС целесообразнее проводить с применением методов гомогенизации или экструзии, что обусловлено высокой производительностью указанных методов, сохранением стабильности липосом и высокого процента включения АГГС в липосомальный бислой. На этапе отделения не включенной в липосомы субстанции АГГС, учитывая нерастворимость данного вещества в воде, можно воспользоваться методом фильтрации, не прибегая к сложным процедурам гель-фильтрации, диализа и т. д. Кроме того, процесс отделения не включившейся субстанции можно совместить со стерилизацией липосомальной дисперсии путем выбора специфического фильтрующего материала.

Ключевые слова: аналог гипоталамического гормона соматостатина, липосомы, технология получения, экструзия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-78-84

FEATURES OF THE TECHNOLOGY OF LIPOSOMAL FORMULATION OF A ANALOGUE HYPOTHALAMIC HORMONE SOMATOSTATIN

E. V. Sanarova¹, Xi Zhang², M. V. Dmitrieva¹, A. V. Lantsova¹, O. L. Orlova¹, A. P. Polozkova¹, N. A. Oborotova^{1, 2}, I. I. Krasnyuk²

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University; 2–4 Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow, 119991, Russia

Background. In connection with the prospect of the use of an analog of the hypothalamic hormone somatostatin synthesized by the laboratory of chemical synthesis Institute of experimental diagnostics and chemotherapy of FSBI «N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center» and showed a high anti-tumor activity as a drug arises a need to establish an optimal technology of its receipt. In preliminary studies in a model formulation for an analog of the hypothalamic hormone somatostatin selected liposome technological process of which has a series of specific steps comprising.

Objective. Development of technology for obtaining liposomal formulation hypothalamic hormone somatostatin analogue.

Materials and methods. Liposomes analog of the hypothalamic hormone somatostatin obtained by method Bengema in modification for hydrophobic substances. To reduce the diameter of the liposome are used methods extrusion, homogenization and ultrasonic. Analysis

of the size of the liposomes was performed by correlation spectroscopy light scattering using nanosizer. The pH of the liposomal dispersion was determined by potentiometry. The quantitative content of the drug substance was determined by spectrophotometry using a standard sample with λ (282 ± 3) nm and an alcoholic solution of empty liposomes as a reference solution. Amount of incorporated drug was calculated as the ratio of the concentration of drug in the liposome dispersion after filtration to the concentration of drug in the dispersion after preparation.

Results and Conclusion. The hydrophobic nature of the substance causes an analog of the hypothalamic hormone somatostatin technological features of obtaining liposomal formulation. Since the step of forming a film of the lipid substance is dissolved in an organic solvent together with lipids, film is hydrated by a solution of cryoprotectant. Grinding liposomes an analog of the hypothalamic hormone somatostatin appropriate to be carried out using homogenization or extrusion methods, due to the high efficiency of these methods, the preservation stability of the liposomes and a high percentage of inclusion an analog of the hypothalamic hormone somatostatin, included in the liposomal bilayer. At the stage of separating the non-inclusion of substance an analog of the hypothalamic hormone somatostatin due to the insolubility of the substance in the water, you can use the filtering method, without the need for complicated procedures gel filtration, dialysis, etc. Furthermore the process of separating a substance not included can be combined with the sterilization of the liposome dispersion by selecting a particular filter material.

Key words: analog of the hypothalamic hormone somatostatin, liposomes, technology of production, extrusion

Введение

В настоящее время повышенный интерес вызывает поиск принципиально новых противоопухолевых веществ среди пептидных гормонов гипоталамуса, которые способны селективно воздействовать на процессы рецепторопосредованного взаимодействия и участвовать в передаче внутриклеточных сигналов [1–3].

В лаборатории химического синтеза Института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») синтезирован новый отечественный аналог гормона гипоталамуса соматостатина (АГГС) — пентапептид аналога гипоталамического гормона соматостатина. На этапе предварительных исследований данной субстанции выявлена ее высокая противоопухолевая активность на перевиваемых солидных опухолях мышей: ДМБА-индуцированных опухолях молочной железы крыс, аденокарциноме предстательной железы крыс R-3327-Н и перевиваемом раке молочной железы человека РМ-1 у бестимусных мышей [4].

Для расширения спектра действия препаратов из группы аналогов гормона соматостатина и в связи с гидрофобными свойствами субстанции АГГС для нее предложена липосомальная лекарственная форма (ЛЛФ). Выбор ЛЛФ в качестве системы доставки данного препарата обусловлен такими положительными свойствами липосом, как повышение биодоступности гидрофобной субстанции [5–10], повышение избирательности действия [11–13] и, как следствие, увеличение терапевтической эффективности [14–17].

В ходе экспериментов, посвященных разработке ЛЛФ АГГС, создана предварительная модель, содержащая в качестве основных компонентов липидного бислоя яичный фосфатидилхолин и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин,

а в качестве криопротектора — сахарозу. Доказана эффективность данной модельной лекарственной формы (ЛФ) на перевиваемой опухоли мышей — аденокарциноме молочной железы Са-755 [18].

Материалы и методы

Материалы. Использованы: АГГС (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), яичный фосфатидилхолин Е РС S (Lipoid, Германия), холестерин (Sigma, Япония), пэгилированный дистеароилфосфатидилэтаноламин PEG-2000-DSPE 18:1 (Lipoid, Германия), сахароза ГОСТ 5833–75 (Химмед, Россия), спирт этиловый 95 % ФС. 2.1.0036.15 (ЗАО «Брынцалов-А», Фереин, Россия), хлороформ стабилизированный ХЧ (Химмед, Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0020.15.

Вспомогательные материалы для фильтрации и экстракции. Применялись: поликарбонатные фильтры Nuclepore диаметром 25, 47 и 90 мм с размером пор 0,2 мкм (Whatman, Великобритания); нейлоновые фильтры Pall N66 диаметром 25, 47 и 90 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО «Палл Евразия», Россия); целлюлозные фильтры диаметром 25 и 47 мм с размером пор 0,22 мкм.

Приборы и аппаратура. Были использованы: весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия), испаритель ротаторный Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Швейцария), водяная баня Büchi Heating Bath B-490 (Büchi Labortechnik AG, Швейцария), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), экструдеры Lipex™ Thermobarrel Extruder на 10, 100 и 800 мл (Northern Lipids Inc., Lipex Biomembranes, Inc., Канада), гомогенизатор Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США), pH-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Получение липосом АГГС. Липосомы АГГС получали методом Бенгема с модификацией для гидрофобных субстанций. Ингредиенты ЛФ (АГГС, яичный фосфатидилхолин, холестерин и PEG-2000-DSPE) растворяли в хлороформе. Полученный раствор переносили в круглодонную колбу и отгоняли органический растворитель при температуре водяной бани 37 °С на ротаторном испарителе до формирования однородной полупрозрачной пленки. Пленку досушивали под вакуумом до полного удаления хлороформа и гидратировали с образованием дисперсии липосом АГГС, которые затем фильтровали и измельчали.

Получение «пустых» липосом АГГС. «Пустые» липосомы получали как и липосомы с действующим веществом, но без добавления субстанции АГГС в состав хлороформного раствора компонентов ЛФ.

Определение размера липосом АГГС. Анализ среднего диаметра липосом АГГС проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния с использованием наносайзера.

Определение рН липосомальной дисперсии АГГС. Определение значений рН в липосомальной дисперсии проводили потенциометрически.

Определение количества препарата, включенного в липосомальную мембрану. Количественное содержание АГГС в ЛФ определяли методом спектрофотометрии с использованием стандартного образца при длине волны 282 ± 3 нм. Поскольку компоненты, входящие в состав липосом (яичный фосфатидилхолин, холестерин и PEG-2000-DSPE), также поглощают в этой области спектра, измерения проводили в сравнении с раствором «пустых» липосом.

Так как АГГС является гидрофобным веществом и при получении липосом включается непосредственно в липидный бислой, количество включенного препарата (КВП) определяли как отношение концентрации АГГС в липосомальной дисперсии после фильтрации ($C_{\text{фил}}$) к концентрации АГГС в липосомальной дисперсии после получения ($C_{\text{пол}}$), выраженное в процентах:

$$\text{КВП (\%)} = C_{\text{фил}} / C_{\text{пол}} \times 100 \text{ \%}.$$

Результаты

Особенности получения многослойных липосом АГГС.

При использовании в качестве липидных компонентов коммерчески доступных фосфатидилхолинов первым этапом в технологическом процессе получения ЛЛФ является получение липидной пленки. Данный этап для гидрофобных веществ, к которым относится АГГС, включает растворение липидов и субстанции в органическом растворителе, последующее смешивание полученных растворов и упаривание до образования однородной пленки.

Критическими технологическими параметрами в процессе получения липидной пленки являются температура и уровень вакуума. В качестве основного липида при разработке ЛЛФ для субстанции АГГС выбран яичный фосфатидилхолин. Этот природный липид имеет приемлемую температуру фазового перехода (37 °С), что важно, поскольку температура формирования липидной пленки должна быть выше температуры фазового перехода липида. В случае фосфатидилхолина температура формирования липидной пленки может находиться в диапазоне 38 ± 2 °С, при такой температуре липосомальные фосфолипиды практически не окисляются. Кроме того, фосфатидилхолин обладает хорошей растворимостью в органических растворителях и биосовместимостью.

Уровень вакуума при получении липидной пленки должен быть подобран исходя из скорости концентрирования липидов из органического раствора [19]. Формирование на стенках колбы равномерно распределенной полупрозрачной пленки с АГГС при отгонке органического растворителя обеспечивается при значении вакуума (–0,8...–0,9) бар и скорости вращения ротора 90–110 об/мин. При более низкой скорости раствор компонентов ЛФ «сползает» со стенок колбы и концентрируется в области дна с образованием толстой липидной пленки. Повышение скорости вращения ротора более 120 об/мин, хотя и способствует увеличению скорости удаления органического растворителя, приводит к получению неравномерной пленки в форме «ободка» на боковой части колбы.

В технологии ЛЛФ в качестве органических растворителей при получении липосом чаще всего применяют этиловый спирт, хлороформ и ацетон. Эти растворители легколетучие и способны растворять как липиды, так и большинство гидрофобных лекарственных субстанций. При получении липосом АГГС используется хлороформ. Он относится к растворителям 2-го класса токсичности, поэтому необходимо добиться полного удаления его из липидной пленки. Это достигается путем длительного досушивания сформированной пленки под вакуумом до постоянной массы. В ходе эксперимента установлено, что оптимальное время сушки липидной пленки с АГГС при значении вакуума (–0,9... –1,0) бар составляет 50 мин.

После досушивания проводят диспергирование (гидратирование) полученной липидной пленки. Именно на данном этапе происходит образование многослойных липосом (МСЛ) и «включение» гидрофобного АГГС в липосомальный носитель путем встраивания его в липидный бислой. Эффективность включения во многом зависит от химических свойств лекарственного вещества. Учитывая коэффициент распределения АГГС в липосомальном бислое,

можно добиться высокой степени его включения и стабильного удерживания в двойном слое липидов путем подбора оптимального соотношения препарат/липид [20].

В качестве растворителей для гидратации липидной пленки с АГГС мы исследовали воду для инъекций и раствор криопротектора (раствор сахарозы). Согласно результатам, представленным в табл. 1, установлено, что оптимальным растворителем для получения дисперсии МСЛ АГГС является раствор сахарозы.

Таблица 1. Выбор растворителя для получения дисперсии многослойных липосом аналога гипоталамического гормона соматостатина

№	Растворитель	Размер липосом, нм		рН дисперсии	КВП, %
		после гидратации	после экструзии		
1	Вода для инъекций	691 ± 25	175 ± 6	6,3 ± 0,2	97 ± 1
2	Раствор сахарозы	330 ± 20	155 ± 6	6,2 ± 0,2	97 ± 1

Примечание. КВП — количество включенного препарата.

Сравнение методов получения однослойных липосом АГГС. Для измельчения липосомальных дисперсий (более 10–30 мл), содержащих большие МСЛ, чаще всего применяют методы экструзии и гомогенизации/микрофлюидизации; гораздо реже используют методы обработки ультразвуком (УЗ), замораживания-оттаивания и дегидратации-регидратации. Каждый из методов имеет как достоинства, так и недостатки.

Экструзия. Уменьшение размеров липосом за счет экструзии обладает множеством преимуществ, таких как получение однородных по размеру везикул; незначительное окисление липосомальных фосфолипидов по сравнению с методом обработки УЗ и методом гомогенизации; возможность регулирования температуры процесса; обеспечение стерильности и др. Кроме того, процесс экструзии способствует более однородному распределению гидрофобного лекарственного вещества в структуре бислоя, что делает данный метод перспективным для получения липосом АГГС.

Экструзию липосомальных дисперсий проводят на экструдерах. В процессе экструзии снижение среднего размера МСЛ достигается «продавливанием» дисперсии через мембраны с порами различного диаметра (от 1,2 до 0,05 мкм) под давлением. Средний размер получаемых липосом определяется диаметром пор, материалом фильтра и количеством циклов, а также зависит от состава липидов и их концентрации.

Для оценки эффективности экструзии при измельчении МСЛ АГГС сравнивали 3 типа фильтрующих мембран — поликарбонатных с диаметром пор 0,2 мкм, нейлоновых с диаметром пор 0,22 мкм и целлюлозных с диаметром пор 0,22 мкм (табл. 2). Предварительно липосомальную дисперсию АГГС для удаления возможных механических включений фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм.

Таблица 2. Размеры липосом аналога гипоталамического гормона соматостатина при экструзии

Число циклов	Размер липосом*, нм		
	поликарбонатный фильтр (0,2 мкм)	нейлоновый фильтр (0,22 мкм)	целлюлозный фильтр (0,22 мкм)
1	183 ± 9	205 ± 10	204 ± 12
2	181 ± 14	231 ± 26	186 ± 11
3	175 ± 6	269 ± 15	169 ± 10
4	171 ± 10	226 ± 18	180 ± 10
5	164 ± 12	185 ± 15	176 ± 6
6	159 ± 10	175 ± 10	180 ± 14
7	151 ± 10	191 ± 10	169 ± 8
8	161 ± 14	184 ± 12	171 ± 12
9	160 ± 10	201 ± 11	183 ± 10
10	163 ± 10	208 ± 10	171 ± 10

Согласно представленным результатам, экструзия липосом АГГС наиболее эффективна при использовании 2 типов фильтров — поликарбонатных и целлюлозных, поскольку позволяет получить однородную липосомальную дисперсию АГГС с наименьшим размером везикул.

Гомогенизация. Для измельчения липосом в промышленных масштабах применяют технологию гомогенизации, причем она подразделяется на стандартную и микрофлюидизацию. В отличие от микрофлюидизации, где поток жидкости выбрасывается и перемешивается в интерактивной камере, в гомогенизаторе жидкий образец продавливается под высоким давлением через отверстие и ударяется о стенку из нержавеющей стали, липосомальная дисперсия продолжительно пропускается через систему гомогенизатора, где под воздействием высокого давления размер липосом постепенно снижается [21].

Основными целями гомогенизации являются получение малых однородных по размеру липосом; улучшение макроскопического вида препарата; улучшение физической стабильности везикул; получение препарата, который может быть отфильтрован через

антимикробные фильтры. На размер везикул, полученных в результате гомогенизации, оказывают большое влияние однородность исходных материалов, тип гомогенизатора и клапана, давление гомогенизации и число циклов, температура, состав липидов и их количественное содержание, ионная сила среды. Обычно для уменьшения размеров липосом с помощью гомогенизатора используют готовые МСЛ. При увеличении давления гомогенизации получают более мелкие везикулы. Вместе с уменьшением среднего размера везикул уменьшается и неоднородность размеров. После 1 или 2 циклов гомогенизации часто получают, по спектроскопической оценке, бимодальный размер распределения, который при продолжении гомогенизации в большинстве случаев переходит в мономодальный.

Размер везикул непрерывно уменьшается при постоянной рециркуляции и в конечном счете приближается к постоянной величине. При определенном и отличном для каждой липосомальной дисперсии количестве циклов размеры липосом достигают минимума, и при продолжении циклов гомогенизации из-за молекулярной диффузии происходит повторное увеличение частиц за счет более мелких (так называемый вторичный рост, или созревание Оствальда). Мелкие везикулы неустойчивы из-за чрезвычайно высокой кривизны мембраны, особенно при наличии в их структуре холестерина. Число мелких везикул

с диаметром до 20 нм, которые можно обнаружить сразу после гомогенизации, резко снижается в течение нескольких минут или часов.

Как показали результаты гомогенизации МСЛ АГГС, представленные в табл. 3, данный метод может быть использован для получения стерильного липосомального лекарственного препарата АГГС в промышленных масштабах.

Неоспоримыми преимуществами применения гомогенизации в ходе масштабирования технологического процесса получения ЛЛФ АГГС являются стандартность состава липосом, высокая производительность, незначительный уровень окисления фосфолипидов (при соблюдении температурного режима), стабильность получаемых липосом. Существенное значение имеют использование серийного промышленного оборудования и получение препарата в стерильных условиях в закрытом режиме, при этом в ходе технологического процесса существует возможность осуществления контроля температуры и давления.

Обработка ультразвуком. Обработка УЗ дисперсии МСЛ выше температуры фазового перехода липидов приводит к формированию однослойных липосом за счет кавитации [22]. Таким способом получают небольшие объемы дисперсий, так как этот метод является одним из самых энергзатратных, требует значительного количества времени для измельчения. Основными критическими факторами являются размер образца и его положение в УЗ-ванне, в результате возникают проблемы с воспроизводимостью. И наконец, в дисперсии после воздействия УЗ присутствует много остаточных крупных частиц. На средний размер получаемых однослойных липосом влияют фосфолипидный состав, концентрация холестерина, температура, время обработки и сила УЗ [23, 24]. Полученные в результате обработки УЗ липосомы АГГС оказались неоднородны и достигли среднего размера преобладающей фракции 179 нм лишь спустя 50 мин озвучивания, при этом показатель рН за данный период снизился с 6,2 до 4,5.

Приведенные данные говорят о нецелесообразности применения УЗ в процессе получения ЛЛФ АГГС.

Исходя из изложенных выше данных, для обработки липосом АГГС в небольших объемах (до 100 мл) целесообразно применять метод экструзии, а для масштабирования технологии получения ЛЛФ – метод гомогенизации.

Отделение субстанции, не включившейся в липосомы, и стерилизация липосомальной дисперсии АГГС. По завершении процесса формирования липосом с включенным в них АГГС необходимо провести отделение свободного («не включенного») вещества. При создании ЛЛФ гидрофобной субстанции для отделения не включенного вещества достаточно

Таблица 3. Размеры липосом аналога гипоталамического гормона соматостатина при гомогенизации

Число циклов	Размер липосом, нм (распределение по фракциям)	
	сразу после гомогенизации	спустя сутки после гомогенизации
1	179 ± 14*	164 ± 9 / 11 ± 2
2	144 ± 9*	151 ± 4 / 11 ± 2
3	153 ± 3*	166 ± 26 / 27 ± 10
4	128 ± 1*	125 ± 2*
5	170 ± 17 / 11 ± 3	130 ± 7 / 15 ± 7
6	135 ± 29 / 28 ± 8	176 ± 2 / 29 ± 16
7	214 ± 58 / 43 ± 6	152 ± 32*
8	168 ± 53 / 40 ± 3	114 ± 9 / 11 ± 2
9	121 ± 7 / 13 ± 2	102 ± 3 / 11 ± 3
10	115 ± 7 / 18 ± 3	111 ± 6 / 19 ± 1
11	116 ± 6 / 11 ± 2	120 ± 27 / 26 ± 15

Примечание. *1 фракция (100 %).

провести стерилизующую фильтрацию через каскад фильтров с различным диаметром пор [25, 26].

ЛЛФ, как и любые ЛФ, используемые для парентерального применения, должны быть стерильны. Можно получать ЛЛФ в асептических условиях, но это сложная и дорогостоящая процедура. Традиционные методы стерилизации, такие как автоклавирование, неэффективны и приводят к существенному нарушению структуры липосом. Предпринимались попытки применять для стерилизации липосом радиационные методы. Однако облучение суспензий липосом и растворов липидов гамма-лучами и электронами в широком диапазоне доз приводило к нарушению их структуры, изменению формы пиков фазовых переходов, агрегации и перекисному окислению липидов. В большинстве случаев для липосомальных дисперсий все же применяют стерилизующую фильтрацию через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм.

Экструзия липосомальной дисперсии АГГС с поликарбонатными фильтрами с диаметром пор 0,2 мкм сочетает в себе метод уменьшения диаметра везикул и стерилизующую фильтрацию.

Завершающей стадией получения стабильной ЛЛФ АГГС является лиофилизация — многофакторный

процесс, который зависит как от природы действующего вещества, так и от состава и соотношения липидов и криопротектора. В настоящее время продолжаются исследования по определению оптимальных условий лиофилизации ЛЛФ АГГС в соответствии с ее особенностями.

Заключение

Рассмотрение особенностей всех стадий технологии получения ЛЛФ, содержащей в качестве действующего вещества АГГС, позволит в дальнейшем при масштабировании производства более тщательно отслеживать все критические точки и параметры данного процесса и обеспечит получение высококачественного отечественного противоопухолевого препарата. Данные биологических экспериментов указывают на перспективность более детального исследования технологии с целью создания высокоэффективного отечественного противоопухолевого средства из группы аналогов соматостатина.

Работа поддержана стипендией Президента РФ на 2015–2017 гг.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. Н. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых препаратов среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(3):128–33.
- Dalm V.A., Hofland L.J., Ferone D. et al. The role of somatostatin and somatostatin analogs in the pathophysiology of the human immune system. J Endocrinol Invest 2003;26(8 Suppl):94–102. PMID: 15233222.
- Danesi R., Agen C., Benelli U. et al. Inhibition of experimental angiogenesis by somatostatin analog octreotide acetate. Clin Cancer Res 1997;3:265–72.
- Яворская Н. П., Голубева И. С., Смирнова З. С. и др. Противоопухолевая активность цифетрелина на основе высокодисперсной эмульсии. Российский биотерапевтический журнал 2008;7(1):33.
- Гулякин И. Д., Санарова Е. В., Ланцова А. В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):78.
- Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Санарова Е. В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):101–8.
- Санарова Е. В., Полозкова А. П., Меерович И. Г. и др. Влияние технологических факторов на качество липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора — тиосенса. Химико-фармацевтический журнал 2011;45(12):32–6.
- Санарова Е. В., Смирнова З. С., Полозкова А. П. Биофармацевтические исследования новой липосомальной лекарственной формы Тиосенса. Биофармацевтический журнал 2011;3(6):33–6.
- Санарова Е. В., Ланцова А. В., Оборотова Н. А. Липосомальные системы доставки лекарственных веществ: свойства и технологические особенности получения. Биофармацевтический журнал 2014;6(4):3–13.
- Санарова Е. В., Ланцова А. В., Полозкова А. П. и др. Эффективность липосомальной системы доставки гидрофобного противоопухолевого фотосенсибилизатора Тиосенса. Российские нанотехнологии 2015;10(5–6):136–43.
- Оборотова Н. А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор). Химико-фармацевтический журнал 2001;35(5):30.
- Оборотова Н. А., Санарова Е. В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов. Российский химический журнал 2012; LVI(3–4):33–40.
- Толчева Е. В., Оборотова Н. А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(1):54–61.
- Дмитриева М. В., Оборотова Н. А., Санарова Е. В., Бунятыян Н. Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(4):21–7.
- Ланцова А. В., Барышникова М. А., Санарова Е. В. и др. Изучение в системе *in vitro* наноструктурированной лекарственной формы лизомустина. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):31.
- Ланцова А. В., Сапрыкина Н. С., Санарова Е. В. и др. Изучение противоопухолевой активности наноструктурированной липосомальной формы лизомустина *in vivo*. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):32.

17. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии. Успехи современной биологии 2009;121(5):464.
18. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Чжан С. и др. Разработка модели липосомальной лекарственной формы нового отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):73–8.
19. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы. Химико-фармацевтический журнал 2011;45(8):30–40.
20. Краснополяский Ю.М., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. Биофармацевтический журнал 2009;3:18–29.
21. Краснополяский Ю.М., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций. Биофармацевтический журнал 2011;3(2):10–8.
22. Richardson E.S., Pitt W.G., Woodbury D.J. The role of Cavitation in Liposome Formation. Biophysical J 2007;93(12):4100–7. DOI: 10.1529/biophysj. 107.104042. PMID: 17766335. PMCID: PMC2098738.
23. Silva R., Ferreira H., Little C. et al. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. Ultrasonics Sonochemistry 2010;17(3):628–32. DOI: 10.1016/j.ultsonch. 2009.10.010. PMID: 199914854.
24. Sułkowski W.W., Pentak D., Nowak K. et al. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. J Mol Struct 2005;744–747: 737–47.
25. Дмитриева М.В., Санарова Е.В., Полозкова А.П. и др. Анализ липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора хлоринового ряда. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):28.
26. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Химико-фармацевтическая и биологическая стандартизация липосомальной лекарственной формы противоопухолевого фотосенсибилизатора тиосенса. Биофармацевтический журнал 2013;5(3):31–5.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ЦИФЕТРИЛИНА (СООБЩЕНИЕ I)

В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Василий Николаевич Осипов ovn65@yandex.ru

Введение. Препарат цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, разработан в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В основу настоящей работы положена идея об использовании цифетрилина в качестве специфического носителя цитотоксических групп.

Цель исследования — синтез цитотоксических аналогов цифетрилина с целью изучения влияния наличия цитотоксических фрагментов на его противоопухолевую активность.

Результаты. Классическими методами пептидной химии синтезированы 5 новых аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами. Соединения получены присоединением к цифетрилину по N-группе цистеина или по N-группе лизина хлорфенацила или гидролизованного цифелина (цитотоксического препарата). Очистку полученных пептидов проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Чистота соединений подтверждена элементным анализом, тонкослойной хроматографией, углом оптического вращения и данными высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведены предварительные исследования их противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях мышей — аденокарциноме молочной железы Ca 755 и меланоме B16.

Заключение. Синтезированы новые пептиды — аналоги цифетрилина, содержащие цитотоксические фрагменты, подтверждены их строение и чистота.

Ключевые слова: аналог соматостатина, противоопухолевая активность, синтетический пептид

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88

CYPHETRYLIN CYTOTOXIC ANALOGUES (REPORT I)

V.N. Osipov, L.P. Sushinina, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, Z.S. Shprakh

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia

Background. The drug cyphetrylin, hypothalamic hormone somatostatin analogue, was developed in N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia. The basis of this work is the idea of using cyphetrylin as a specific carrier of cytotoxic groups.

Objective. Synthesis of cytotoxic cyphetrylin analogues in order to study the effect of the presence of cytotoxic agents on its antitumor activity.

Results. The classical methods of peptide chemistry were used for 5 the new cyphetrylin analogues synthesis. The compounds have been obtained by the addition to the cyphetrylin Na-group of the cysteine or lysine N α -group chlorophenacyl or hydrolyzed cyphelin (cytotoxic agent). Purification of the peptides was performed by column chromatography on silica gel. The purity of the obtained compounds was confirmed by elemental analysis, TLC, optical rotation angle data and HPLC. Preliminary studies of anti-tumor activity were performed in mice transplanted tumors: adenocarcinoma Ca 755 breast and melanoma B16.

Conclusions. New peptides — analogues cyphetrylin containing cytotoxic fragment have been synthesized, their structure and purity have been confirmed.

Key words: somatostatin analogue, antitumor activity, synthetic peptide

Введение

Препарат цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, разработан в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [1].

Механизм противоопухолевой активности цифетрилина и других аналогов соматостатина определяется

2 возможными путями реализации их ингибирующего действия — прямого и опосредованного. Прямой цитотоксический эффект обусловлен связыванием этих соединений с рецепторами к соматостатину на поверхности опухолевых клеток. Опосредованный антипролиферативный эффект соматостатина обусловлен торможением секреции ряда гормонов и факторов

роста опухолей (инсулиноподобного фактора роста, гастрин, глюкагона, вазоактивного интестинального пептида, инсулина, холецистокинина, мотилина, серотонина и др.) [2, 3].

Синтезирован большой ряд аналогов соматостатина, и показана их противоопухолевая активность [2, 4–9].

В основу настоящей работы положена идея об использовании цифетрилина в качестве специфического носителя цитотоксических групп с целью возможного увеличения прямого цитотоксического эффекта. В литературе имеются сведения о подобных исследованиях, направленных на поиск потенциальных противоопухолевых соединений в ряду цитотоксических аналогов гипоталамических гормонов. Адресная доставка цитотоксических агентов к опухолям с помощью специфических носителей в некоторых случаях приводила к положительным результатам [10, 11].

Цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, представляет собой защищенный по функциональным группам пентапептид (метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина).

В статье представлен синтез 5 цитотоксических производных цифетрилина. Метилловый эфир N^α-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилацетил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-лизилтреонина (ClPhe-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe) (1) и метилловый эфир N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалил-S-тетрагидропиранил-цистеинил-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-лизилтреонина (AcSarVal-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe) (2) получены присоединением к цифетрилину по N^α-аминогруппе цистеина цитотоксических фрагментов: п-ди-(2-хлорэтил)-амино-фенилуксусной кислоты (ClPhe, хлорфенацила) и N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалина (AcSarVal, гидролизованного цифелина) соответственно. Метилловый эфир N^α-трет-бутил-оксикарбонил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилацетил-лизилтреонина (Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(ClPhe)-Thr-OMe) (3) и метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-(N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалил)лизилтреонина (Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(AcSarVal)-Thr-OMe) (4) получены присоединением к цифетрилину по N^ε-группе лизина хлорфенацила и гидролизованного цифелина соответственно. Тетрапептид — метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонилфенил-аланил-D-триптофил-N^ε-(N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-

аминофенилаланилвалил)-лизилтреонина (Boc-Phe-D-Trp-Lys(AcSarVal)-Thr-OMe) (5) представляет собой промежуточный цитотоксический аналог в синтезе пентапептида 4.

Материалы и методы

Синтез осуществляли классическими методами пептидной химии. При реализации намеченной схемы синтеза реакции конденсации проводили в условиях, сводящих к минимуму возможность рацемизации отдельных аминокислот. При синтезе фрагментов использовали методы смешанных ангидридов и активированных эфиров.

Выбор защитных групп определяли требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α-аминогрупп на всех стадиях синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу (Boc). Карбоксильную группу C-концевого аминокислотного остатка треонина защищали этерификацией (метилловый эфир). Для защиты реакционноспособной группы лизина в боковой цепи использовали бензилоксикарбонильную защиту (Z), для защиты боковой группы цистеина применяли тетрагидропиранильную защиту (Thp).

Удельное вращение измеряли на поляриметре Unipol L (Германия). Для очистки защищенного пентапептида 1 использовали колоночную хроматографию на силикагеле Kieselgel 40/63 (Merck, Германия). Для тонкослойной хроматографии применяли пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия) с тонким слоем силикагеля, в качестве растворителя использовали хлороформ и метанол в соотношении 9:1. Вещества обнаруживали на хроматограммах при обработке парами йода, а также при проявлении 0,5 % раствором нингидрина в этаноле. Чистоту полученных соединений и содержание примесей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu. Колонка Reprosil-Pur Basic C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Условия: линейный градиент АВ — 5 % В (0 мин) — 100 % В (20 мин). А — 0,01 % трифторуксусная кислота в воде, В — 0,01 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле.

Противоопухолевую активность цитотоксических аналогов цифетрилина исследовали на перевиваемых штаммах опухолей мышей.

Результаты и обсуждение

Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 1 и 2 осуществляли по схеме 1 (рис. 1).

Для получения цифетрилина (соединение 13) синтез осуществляли постепенным наращиванием пептидной цепи, начиная с C-концевой аминокислоты

треонина [7]. После снятия трет-бутилоксикарбонильной защитной группы с N^α-цистеина трифторуксусной кислотой соединение 14 конденсировали методом активированных эфиров с п-ди-(2-хлорэтил) аминофенилуксусной кислотой. В результате хроматографической очистки получали соединение 1. C₅₉H₇₄N₈O₁₁SCl₂. Вычислено, %: Cl 6,04; S 2,72. Найдено, %: Cl 5,92; S 2,74; R_f 0,79 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –20° (C = 1, диметилформамид); содержание основного вещества – 97,0 % (ВЭЖХ).

Соединение 2 получали конденсацией соединения 14 с N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалином, полученным щелочным гидролизом цифелина. C₆₇H₈₈N₁₀O₁₃SCl₂. Вычислено, %: Cl 5,28; S 2,38. Найдено, %: Cl 5,44; S 2,65; R_f 0,51 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –7° (C = 1, диметилсульфоксид); содержание основного вещества – 96,0 % (ВЭЖХ).

Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 3 и 4 осуществляли по схеме 2 (рис. 2).

Соединение 4: C₆₄H₉₁N₁₀O₁₃SCl₂. Вычислено, %: Cl 5,41; S 2,44. Найдено, %: Cl 5,4; S 2,55; R_f 0,48 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D +12° (C = 1, диметилформамид).

В ходе синтеза был выделен цитотоксический тетрапептид Boc-Phe-D-Trp-Lys (Ac-Sar-Val)-Thr-OMe 5. C₅₆H₇₇N₉O₁₁Cl₂. Вычислено, %: Cl 6,32. Найдено, %: Cl 6,08, %; R_f 0,49 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –5° (C = 1, диметилформамид).

Синтезированные цитотоксические аналоги цифетрилина (соединения 1–4) и промежуточный цитотоксический тетрапептид 5 исследовали на противоопухолевую активность в лаборатории экспериментальной химиотерапии.

При предварительном изучении противоопухолевой активности синтезированных аналогов цифетрилина на перевиваемых опухолях мышей (аденокарциноме молочной железы Ca755 и меланоме B16) соединения, содержащие цитотоксические группы по N^α-группе цистеина (соединения 1 и 2), не проявили активности. Соединения с цитотоксической группой по N^ε-группе лизина 3, 4 и 5 проявили статистически значимый противоопухолевый эффект, что позволяет продолжить их изучение. Результаты изучения противоопухолевой активности цитотоксических аналогов цифетрилина и анализ полученных данных будут представлены в следующем сообщении.

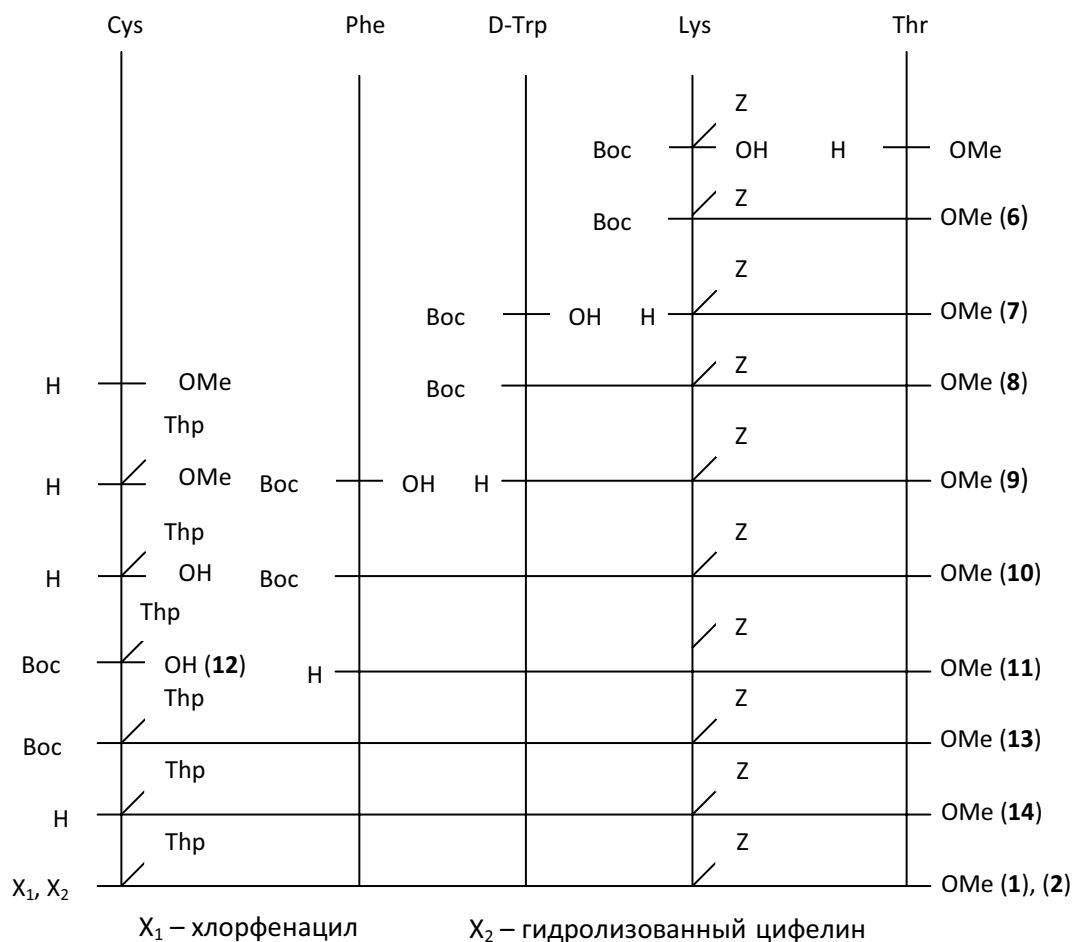


Рис. 1. Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 1 и 2

Cys	Phe	D-Trp	Lys	Thr
			Z	
	Boc			OMe (10)
			H	
	Boc			OMe (15)
			X ₁ , X ₂ *	
	Boc			OMe (16), (5)
			X ₁ , X ₂ *	
Thp				
OH (12)	H			OMe (17), (18)
Thp				
			X ₁ , X ₂ *	OMe (3), (4)

X₁ – хлорфенацилX₂ – гидролизированный цифелин

Рис. 2. Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 3 и 4

Заключение

Классическими методами пептидной химии синтезированы 5 новых аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами. Соединения получены присоединением хлорфенацила или гидролизованного цифелина к цифетрилину по N^α-группе цистеина (соединения 1, 2) и по N^ε-группе лизина (соединения 3, 4 и соединение 5, тетрапептид, содержащий гидролизированный цифелин по N^ε-группе лизина).

Очистку полученных пептидов проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Проведено предварительное исследование противоопухолевой активности полученных соединений на перевиваемых опухолях мышей (аденокарциноме молочной железы Ca755 и меланоме B16). Результаты исследования позволяют продолжить изучение соединений с цитотоксической группой по N^ε-группе лизина (соединения 3, 4 и тетрапептид 5).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ № 2254139.
2. Schally A.V., Comary-Schally A.M., Nagy A. et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:248–91. DOI: 10.1006/frne.2001.0217. PMID: 11587553.
3. Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Annals of Oncology* 2006;17(12):1733–42. DOI: 10.1093/annonc/mdl105. PMID: 16801334.
4. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С. Синтетические пептидные аналоги соматостатина: стратегии синтеза и перспективы поиска новых противоопухолевых препаратов. *Химико-фармацевтический журнал* 2015;49(6):3–9.
5. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):47–53.
6. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Влияние синтетических пептидных агонистов соматостатина на рост перевиваемых опухолей мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):57–60.
7. Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых соединений среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;3:123–7.
8. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Игнатьева Е.В. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал* 2014;48(3):19–22.
9. Smirnova L.I., Smirnova A.P., Ustinkina S.V. et al. Synthesis and antitumor activity of modified somatostatin analogues. Flegel M., Fridkin M., Gilon C., Slaninova J. (Ed.) *Peptides 2004 Proceedings of the Third International and Twenty-Eighth European Peptide Symposium*, September 5–10. Prague, Czech Republic, 2004. P. 946–947.
10. Смирнова Л.И., Смирнова З.С., Устинкина С.В. Синтез и противоопухолевая активность гормона гипоталамуса меланостатина и его аналогов. *Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. М., 2003. С. 261–280.*
11. Nagy A., Schally A.V. Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancer expressing their receptors: a “smarter” chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design* 2005;11(9):1167–80. PMID: 15853664.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С АНТИПИРИНОМ

И.С. Голубева¹, Н.П. Яворская¹, М.А. Барышникова¹, Д.А. Афанасьева¹, А.А. Рудакова¹,
Г.Н. Апрышко¹, Н.С. Рукк², А.Ю. Скрыбина²

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

² ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ); Россия, 119454 Москва, проспект Вернадского, 78

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Цель работы — исследование потенциальной противоопухолевой активности координационных соединений редкоземельных элементов.

Материалы и методы. Исследованы цитотоксическая (*in vitro*) и противоопухолевая (*in vivo*) активность 28 координационных соединений редкоземельных элементов — иодиды и перхлораты, содержащие в качестве лиганда антипирин.

Результаты. Исследованные соединения в концентрации 100 мкМ не оказывали цитотоксического действия на клетки опухолей человека 5 линий различного гистогенеза. Однако в экспериментах на животных с солидными перевиваемыми опухолями обнаружена противоопухолевая активность для двух комплексов — антипириновых производных иодидов гадолиния и неодима.

Заключение. Полученные данные указывают на целесообразность более углубленного изучения противоопухолевой активности 2 комплексов (антипириновых производных иодидов гадолиния и неодима) на большем количестве мышей, с изменением доз, в том числе на асцитных опухолях, а также при подкожном и пероральном путях введения.

Ключевые слова: комплексы лантаноидов с антипирином, цитотоксичность, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-89-95

POTENTIAL ANTITUMOR ACTIVITY STUDIES ON SOME COORDINATION COMPOUNDS OF RARE EARTH ELEMENTS WITH ANTIPYRINE

I.S. Golubeva¹, N.P. Yavorskaya¹, M.A. Baryshnikova¹, D.A. Afanasieva¹, A.A. Rudakova¹,
G.N. Apryshko¹, N.S. Rukk², A.Yu. Skryabina²

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia;

² Moscow Technological University (MITHT); 78 Prospekt Vernadskogo, Moscow, 119454, Russia

The aim of this study was to examine the anticancer activity of rare earth elements complexes with antipyrine.

Materials and methods. We have studied the cytotoxic activity of *in vitro* and antineoplastic activity *in vivo* of 28 iodides and perchlorates containing as a ligand antipyrine.

Results. Here we show, that none of tested compounds exert cytotoxic action on 5 human cancer cell lines of different histogenesis at a concentration of 100 μM. However, we observe that two complexes of antipyrine derivatives with iodides of gadolinium and neodymium possess anti-tumor activity in experiments with transplantable solid tumors.

Conclusion. The data obtained indicate the feasibility of further studies of these two complexes on a larger number of mice, with changing doses and routes of administration. We also suggest the investigation of these compounds on ascites tumors.

Key words: lanthanide complexes with antipyrine, cytotoxicity, antitumor activity

Введение

В последние годы растет интерес к исследованию координационных соединений редкоземельных элементов (РЗЭ) как потенциальных средств для диагностики и лечения рака [1–8].

В обзорах обобщены данные литературы о комплексных соединениях РЗЭ, проявляющих противоопухолевую активность [9, 10]. Цитотоксическую и антипролиферативную активность проявляют комплексные соединения РЗЭ с некоторыми органическими

лигандами, многие из которых являются биологически активными соединениями (плюмбагин; 3,5-пиразолдикарбоновая кислота; 2-тиоацетатбензотиазол; производные геспертина, порфирина, 8-оксихинолина, кумарина, пиразолона, 5-фторурацила и фталоцианина; лиганды, содержащие ацетилацетонатные, 1,10-фенантролиновые фрагменты, и др.). Интересно, что в большинстве случаев противоопухолевая активность комплексов выше в сравнении с активностью лигандов и исходных солей РЗЭ и часто превышает активность цисплатина и других лекарственных препаратов. Кроме взаимодействия с ДНК, сообщалось о таких механизмах действия цитотоксических комплексов РЗЭ, как ингибирование кальциевых потоков, антиоксидантные свойства, гидролитическое расщепление фосфатно-эфирных связей, ингибирование тиоредоксинредуктазы, разрушение митохондрий, индукция апоптоза [2].

Значительный интерес представляют комплексы антипирина (2,3-диметил-1-фенил-3-пиразолин-5-он, AP) и его производных с РЗЭ. В работах исследованы строение и физико-химические свойства комплексов иодидов и перхлоратов РЗЭ с антипирином [5, 11]. Изучение цитотоксичности на линиях клеток NCTC clone L929 (фибробласты, полученные из клеток подкожной соединительной ткани мышей С3Н/Ап) и клеток Нер-2 (эпидермоидная карцинома гортани человека) показало, что комплексы при равных концентрациях ингибируют клетки обоих типов в большей степени, чем несвязанный антипирин [5].

Цель работы — исследовать потенциальную противоопухолевую активность координационных соединений РЗЭ, синтезированных в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» (переименован в ФГБОУ ВО «Московский технологический университет», МИТХТ), *in vitro* и *in vivo* по методикам, применяемым в ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») при поиске новых противоопухолевых средств.

Материалы и методы

Исследование противоопухолевой активности соединений проводили в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под ред. А.Н. Миронова [12].

При исследовании противоопухолевой активности *in vitro* (цитотоксичности) использовали клеточные линии 5 опухолей человека различного гистогенеза: карциномы толстой кишки НСТ116, аденокарциномы простаты РС3, аденокарциномы легкого А549, аденокарциномы молочной железы MCF-7, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat — полученные

из Банка клеточных линий ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Цитотоксичность оценивали с помощью МТТ-теста [13].

Для постановки МТТ-теста клеточные линии культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах (Costar, USA) в течение суток в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин, аминокислоты, пируват натрия и раствор витаминов («ПанЭко», Россия), при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Затем в каждую лунку добавляли исследуемые соединения в конечной концентрации 100 мкМ. Клетки инкубировали в присутствии изучаемых соединений в течение 72 ч в 5 % CO₂ при 37 °С. Эксперименты с каждым соединением повторяли трижды. Водорастворимые соединения растворяли в воде, нерастворимые или плохо растворимые — в диметилсульфоксиде, так, чтобы концентрация диметилсульфоксида или воды в лунке не превышала 1 %. В качестве контроля использовали лунки с клетками, содержащие 1 % диметилсульфоксида или воды в полной ростовой среде.

Процент ингибирования роста клеток (И) рассчитывали по формуле:

$$И = (1 - (О_0/О_к)) \times 100 \%,$$

где О₀ — оптическая плотность в опытных лунках, О_к — оптическая плотность в контрольных лунках.

Соединение считали активным, если оно подавляло рост клеток более чем на 50 % в концентрации ≤ 100 мкМ (ИК₅₀ ≤ 100 мкМ).

Противоопухолевую активность *in vivo* исследовали на перевиваемых опухолях мышей. Использованы традиционно применяемые при первичном изучении противоопухолевой активности перевиваемые опухоли: асцитная форма лимфоцитарного лейкоза Р-388, асцитная форма опухоли Эрлиха, солидные опухоли — аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ, меланома В-16, рак легкого Льюис. Штаммы перевиваемых опухолей получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Опухоли поддерживались *in vivo* путем внутримышечной перевивки (меланома В-16 и рак легкого Льюис — на мышцах линии С57В1/6, рак толстой кишки АКАТОЛ — на мышцах линии BALB/С), а также внутрибрюшинной перевивки (лимфоцитарный лейкоз Р-388 — на мышцах линии DBA₂, опухоль Эрлиха — на беспородных мышцах).

В терапевтических опытах использованы мыши (самки) разведения отдела лабораторных животных ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» следующих линий: гибриды первого поколения (С57В1/6j x DBA₂) F1 (В6D2F1), BALB/С и DBA₂ в возрасте 1,5–2 мес с начальной массой 19–23 г.

Мышей содержали в виварии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» в помещении с дневным освещением, контролем температуры и влажности воздуха, на брикетированном корме с постоянным доступом к воде. Все эксперименты проводили в соответствии с правилами работы с животными согласно международным и российским нормам [14].

Перед опытами мышей распределяли по группам. В контрольной группе с опухолью без специфического воздействия было 10 мышей, в опытных группах — 6–7 животных. Наблюдение за мышами проводили до их гибели.

Для терапевтического эксперимента клетки лейкоза Р-388 и опухоли Эрлиха перевивали по стандартной методике гибридам В6D2F1 внутрибрюшинно — по 10^6 клеток на мышь в 0,4 мл питательной среды 199. Средняя продолжительность жизни мышей с привитыми асцитными опухолями составила 9–11 дней (для лейкоза Р-388) и 12–20 дней (для опухоли Эрлиха).

Солидные опухоли перевивали, инокулируя подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1: 10 (5×10^6 клеток) рака толстой кишки АКАТОЛ — мышам линии BALB/C, меланомы В-16 и рака легкого Льюис — мышам гибридной линии В6D2F1.

Лечение мышей с асцитными опухолями начинали через 24 ч, а мышей с солидными опухолями — через 48 ч после перевивки опухолей. Дозы рассчитывали индивидуально на мышь. Растворы субстанций изучаемых соединений готовили непосредственно перед их введением.

Мышам с асцитными опухолями исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней через 24 ч (лимфолейкоз Р-388 — в дозе 150 мг/кг, опухоль Эрлиха — 120–100 мг/кг). Мышам с солидными опухолями соединения вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней через 24 ч в дозах 100 мг/кг (меланома В-16) и 120 мг/кг (рак толстой кишки АКАТОЛ и рак легкого Льюис).

Результаты лечения оценивали по показателям торможения роста опухоли (ТРО) и увеличения продолжительности жизни. ТРО (%) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО} = (V_k - V_0) / V_k \times 100 \%,$$

где V_k и V_0 — средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров 3 перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на разных сроках после окончания лечения.

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых животных по сравнению с контрольной группой вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ} = (\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100 \%,$$

где СПЖ₀ и СПЖ_к — средняя продолжительность жизни (сутки) мышей в опытной и контрольной группах. Показатели эффективности изучаемых соединений определяли в сравнении с контрольной группой.

Активными в противоопухолевом отношении считали дозы соединений, вызывающие ТРО ≥ 50 % продолжительностью не менее 16 дней после окончания лечения или УПЖ ≥ 25 %.

Токсичность доз соединений оценивали по срокам гибели леченых животных в сравнении с гибелью животных в контрольной группе. Состояние животных визуально оценивали ежедневно.

Для исследования потенциальной противоопухолевой активности были переданы синтезированные ранее [5, 15] 28 соединений РЗЭ, из которых 14 — иодида, а 14 — перхлораты координационных соединений лантаноидов (кроме прометия), содержащих в качестве лиганда антипирин (табл. 1). На рисунке представлены примеры структурных формул изученных соединений.

Для сравнения была исследована цитотоксичность чистого 1-фенил-2,3-диметилпиразолон-5 (антипирина) и 3 его производных (табл. 2).

Результаты и обсуждение

В табл. 3 представлены показатели ингибирования роста клеточных линий под действием изученных соединений.

Из приведенных данных видно, что в концентрации 100 мкМ ни одно из соединений не ингибировало рост опухолевых клеток 5 использованных линий на 50 %. Поскольку согласно критерию, указанному в [12], активными считаются вещества с $\text{ИК}_{50} \leq 100$ мкМ, можно сделать вывод, что исследованные соединения цитотоксическую активность не проявили.

Влияние иодидов координационных соединений лантаноидов, содержащих в качестве лигандов антипирин, было изучено ранее с использованием МТТ-теста в культурах мышинных фибробластов L929, клон NCTN, и клеток эпидермоидного рака человека Нер-2 [5]. Исследованы 4 концентрации: 0,001; 0,01; 0,1 и 1,0 мг/мл. Пересчет на молярные концентрации показал, что выживаемость фибробластов в присутствии 530 мкМ антипирина составляла $81,3 \pm 4,8$ % (т. е. всего около 20 % торможения роста клеток), а все исследованные координационные соединения приблизительно в тех же молярных концентрациях ингибировали рост фибробластов в большей степени. Наиболее активным было соединение лутеция, в присутствии 590 мкМ которого выживаемость фибробластов снижалась до $39,0 \pm 8,6$ %, что соответствует около 60 % торможения

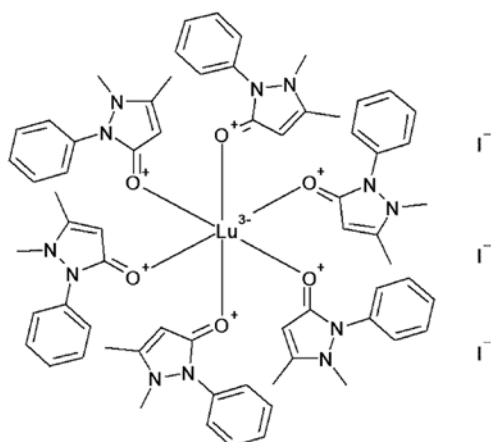
Таблица 1. Изученные координационные соединения лантаноидов

Химическое название соединения	Шифр
Иодиды:	
иодид гексакис (антипирин) лантана (III) $[La(AP)_6]I_3$	57-I
иодид гексакис (антипирин) церия (III) $[Ce(AP)_6]I_3$	58-I
иодид гексакис (антипирин) празеодима (III) $[Pr(AP)_6]I_3$	59-I
иодид гексакис (антипирин) неодима (III) $[Nd(AP)_6]I_3$	60-I
иодид гексакис (антипирин) самария (III) $[Sm(AP)_6]I_3$	62-I
иодид гексакис (антипирин) европия (III) $[Eu(AP)_6]I_3$	63-I
иодид гексакис (антипирин) гадолиния (III) $[Gd(AP)_6]I_3$	64-I
иодид гексакис (антипирин) тербия (III) $[Tb(AP)_6]I_3$	65-I
иодид гексакис (антипирин) диспрозия (III) $[Dy(AP)_6]I_3$	66-I
иодид гексакис (антипирин) гольмия (III) $[Ho(AP)_6]I_3$	67-I
иодид гексакис (антипирин) эрбия (III) $[Er(AP)_6]I_3$	68-I
иодид гексакис (антипирин) тулия (III) $[Tm(AP)_6]I_3$	69-I
иодид гексакис (антипирин) иттербия (III) $[Yb(AP)_6]I_3$	70-I
иодид гексакис (антипирин) лютеция (III) $[Lu(AP)_6]I_3$	71-I
Перхлораты:	
перхлорат гексакис (антипирин) лантана (III) $[La(AP)_6](ClO_4)_3$	57-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) церия (III) $[Ce(AP)_6](ClO_4)_3$	58-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) празеодима (III) $[Pr(AP)_6](ClO_4)_3$	59-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) неодима (III) $[Nd(AP)_6](ClO_4)_3$	60-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) самария (III) $[Sm(AP)_6](ClO_4)_3$	62-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) европия (III) $[Eu(AP)_6](ClO_4)_3$	63-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) гадолиния (III) $[Gd(AP)_6](ClO_4)_3$	64-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) тербия (III) $[Tb(AP)_6](ClO_4)_3$	65-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) диспрозия (III) $[Dy(AP)_6](ClO_4)_3$	66-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) гольмия (III) $[Ho(AP)_6](ClO_4)_3$	67-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) эрбия (III) $[Er(AP)_6](ClO_4)_3$	68-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) тулия (III) $[Tm(AP)_6](ClO_4)_3$	69-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) иттербия (III) $[Yb(AP)_6](ClO_4)_3$	70-Cl
перхлорат гексакис (антипирин) лютеция (III) $[Lu(AP)_6](ClO_4)_3$	71-Cl

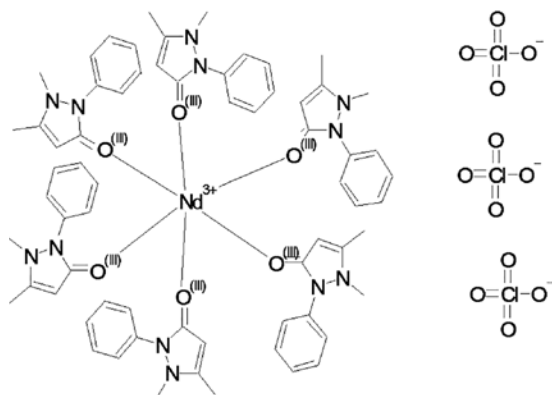
Таблица 2. Изученные производные антипирина

Химическое название соединения	Шифр
1-фенил-2,3-диметилпиразолон-5 (антипирин) $C_{11}H_{12}N_2O$	AP
2- (4-хлорфенил) – 5-метил-4Н-пиразол-3-он $C_{10}H_9ClN_2O$	AP-Me-Cl
4-амино-1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3Н-пиразол-3-он $C_{11}H_{13}N_3O$	AAP
5-метил-2-фенил-2,4-дигидро-3Н-пиразол-3-он $C_{10}H_{10}N_2O$	AP-Me

Иодид гексакис(антипирин)лютеция(III)



Перхлорат гексакис(антипирин)неодима(III)



Примеры структурных формул изученных соединений

роста клеток. Аналогичная тенденция увеличения способности роста клеток при переходе от антипирин к содержащим его координационным соединениям РЗЭ наблюдалась в культуре клеток линии Нер-2.

Несовпадение полученных нами отрицательных результатов оценки цитотоксичности с данными литературы может быть обусловлено использованием в эксперименте [5] более высоких концентраций испытуемых соединений.

На основании результатов [5] 2 соединения — иодид гексакис (антипирин) неодима (III) (60-I) и иодид гексакис (антипирин) гадолиния (III) (64-I) — были изучены *in vivo*. Выбор в качестве комплексообразователей неодима и гадолиния обусловлен особенностями их электронного строения, приводящего к возникновению «гадолиниевого излома» и вторичной периодичности [16].

Подбор доз для исследования соединений проводили на асцитных опухолевых моделях мышей — лимфолейкозе Р-388 и опухоли Эрлиха. Для терапевтических экспериментов были выбраны переносимые дозы 100 и 120 мг/кг.

Таблица 3. Результаты скрининга *in vitro*

Концентрация соединений 100 мкМ	Ингибирование роста клеточных линий, %				
	HCT-116	Jurkat	MCF-7	PC-3	A549
64-I	1	19	−4	28	−7
60-I	12	26	−5	30	1
57-I	5	8	5	19	6
62-I	1	5	3	30	7
59-I	15	9	17	46	16
58-I	7	5	17	20	10
63-I	3	16	0	32	5
65-I	0	7	7	35	7
66-I	2	6	9	27	5
67-I	−14	−3	−8	26	−10
68-I	−2	−1	−2	20	1
69-I	1	0	−2	15	8
70-I	4	−2	8	14	8
71-I	4	0	0	12	12
57-Cl	23	−1	6	17	2
58-Cl	19	−6	−1	21	1
59-Cl	19	−4	19	26	−4
60-Cl	21	−5	11	9	7
62-Cl	23	−11	12	24	6
63-Cl	24	−7	13	17	5
64-Cl	23	−7	13	27	3
65-Cl	27	−4	11	7	5
66-Cl	25	2	1	26	13
67-Cl	16	−5	7	24	−1
68-Cl	24	3	5	21	7
69-Cl	24	−2	5	19	8
70-Cl	25	−2	12	24	17
71-Cl	23	5	10	19	10
AP	17	2	12	10	4
AP-Me-Cl	35	−21	2	23	−11
AAP	17	5	7	10	4
AP-Me	20	−4	4	26	10

При исследовании на солидной опухоли меланоме В-16 (табл. 4) доза 100 мг/кг, вводимая ежедневно внутривенно 5 раз через 24 ч, показала наличие противоопухолевого эффекта по окончании лечения животных у соединения 64-I (ТРО = 78 %), эффект

Таблица 4. Противоопухолевая активность соединений на модели меланомы В-16

Соединение	Доза, мг/кг 5 × 24 ч	ТРО, %							ПЖ, дни	СПЖ, дни	УПЖ, %	Средний вес опухоли, г	Гибель, n/n
		дни после окончания лечения											
		1	4	8	12	15	19	22					
64-I	100	78*	23	53*	59*	50*	54*	35	29—45	38,3	-	9,2	0/6
60-I	100	48*	+28	29	38*	62*	49*	32	35—49	43,3	-	12,3	0/6
Контроль									31—72	50		10	

Примечание. Здесь и в табл. 5, 6: ТРО – торможение роста опухоли, ($p \leq 0,05$), ПЖ – продолжительность жизни животных (минимум – максимум), СПЖ – средняя продолжительность жизни, УПЖ – увеличение продолжительности жизни. * Статистически достоверно по сравнению с контролем, п/п – количество павших животных / количество выживших животных; введение препарата – внутрибрюшинное.

Таблица 5. Противоопухолевая активность соединений на модели рака толстой кишки АКАТОЛ

Соединение	Доза, мг/кг 5 × 24 ч	ТРО, %									ПЖ, дни	СПЖ, дни	УПЖ, %	Средний вес опухоли, г	Гибель, п/п
		дни после окончания лечения													
		1	4	8	13	16	20	23	27	29					
64-I	120	39*	53*	49*	47*	54*	48*	52*	42*	38*	64—73	68	-	5	0/7
60-I	120	39*	55*	57*	59*	60*	52*	52*	54*	44*	61—77	68	-	5	0/7
Контроль											63—73	68		8	

Таблица 6. Противоопухолевая активность соединений на модели рака легкого Льюис

Соединение	Доза, мг/кг 5 × 24 ч	ТРО, %							ПЖ, дни	СПЖ, дни	УПЖ, %	Средний вес опухоли, г	Гибель, п/п
		дни после окончания лечения											
		1	4	8	12	15	19	22					
64-I	120	46*	54*	57*	60*	53*	54*		25—31	29	11	10	0/6
60-I	120	57*	48*	53*	57*	48*	41*		23—31	27	5	11	0/6
Контроль									20—31	26		12	

сохранялся в процессе наблюдения на уровне 54 % до 19-го дня. Соединение 60-I не проявило противоопухолевого эффекта в этой дозе.

В табл. 5 представлены результаты определения противоопухолевой активности на модели рака толстой кишки АКАТОЛ. В дозе 120 мг/кг при введении ежедневно внутрибрюшинно 5 раз через 24 ч оба соединения оказывали на опухоль АКАТОЛ небольшое противоопухолевое действие (ТРО = 53–52 % для 64-I и ТРО = 55–54 % для 60-I), сохраняющиеся до 23 и 27-го дня наблюдения после окончания лечения, соответственно.

Результаты, полученные на модели рака легкого Льюис, показали, что оба соединения обладают пороговой активностью, сохраняющейся для соединения 64-I до 19-го дня, а для соединения 60-I – до 12-го дня наблюдения после окончания лечения (табл. 6).

Заключение

Все изученные соединения не оказывали цитотоксического действия на клетки опухолей человека линий НСТ-116, РС-3, А549, МСF-7, Jurkat *in vitro* в концентрации 100 мкМ.

Обнаружено противоопухолевое действие *in vivo* соединения 64-I на мышинные рак толстой кишки АКАТОЛ, рак легкого Льюис и меланому В-16 и соединения 60-I на мышинные рак толстой кишки АКАТОЛ и рак легкого Льюис.

Результаты исследования указывают на целесообразность дальнейшего изучения противоопухолевой активности соединений 64-I и 60-I при других режимах и способах введения (подкожном и пероральном). Возможно также исследование противоопухолевой активности *in vivo* других координационных соединений лантаноидов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Рукк Н.С., Скрябина А.Ю., Апрышко Г.Н. Поиск потенциальных противоопухолевых комплексных соединений редкоземельных металлов. Российский биотерапевтический журнал 2009;2:14–5.
2. Baran E.J. La Nueva Farmacoterapia Inorgánica. XVIII. Compuestos de Lantánidos. Lat Am J Pharm 2007;26(4):626–34.
3. Karthikeyan G., Mohanraj K., Elango K.P., Girishkumar K. Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial activity of lanthanide – tetracycline complexes. Transition Met Chem 2004;29(1):86–90.
4. Liu Y., Wang Z., Zhang Z. et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of ternary complexes of all-trans retinoic acid with earth metals. J Coord Chem 1999;47(3):441–50.
5. Rukk N.S., Albov D.V., Shamsiev R.S. et al. Synthesis, X-ray crystal structure and cytotoxicity studies of lanthanide(III) iodide complexes with antipyrine. Polyhedron 2012;44:124–32.
6. Xi P.-X., Xu Z.-H., Liu X.-H. et al. Synthesis, characterization, antioxidant activity, and DNA-binding studies of 1-Cyclohexyl-3-tosylurea and its Nd (III), Eu (III) complexes. Chem Pharm Bull 2008;56(4):541–6. PMID:18379105.
7. Yang L., Tao D., Yang X. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of some rare earth metal complexes of pipemidic acid. Chem Pharm Bull 2003;51(5):494–8. PMID: 12736446.
8. Zhang J., Yang M. Research progress on drugs of rare earth complexes. Chin.J. Rare Metals 2005;29(6):919–26.
9. Рукк Н.С., Апрышко Г.Н., Скрябина А.Ю. Перспективность создания противоопухолевых лекарств на основе координационных соединений элементов ПИВ группы. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):47–50.
10. Teo R.D., Termini J., Gray H.B. Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. J Med Chem 2016 Jul 14;59(13):6012–24. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01975. PMID: 26862866.
11. Rukk N.S., Albov D.A., Shamsiev R.S. et al. Antipyrine complexes of rare earth iodides and perchlorates: structure and properties. Chem Listy 2012;106:991.
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
13. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1–2):55–63. PMID: 6606682.
14. Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».
15. Рукк Н.С., Шамсиев Р.С., Кравченко В.В. и др. Спектральное и квантово-химическое исследование антипириновых производных некоторых комплексных соединений РЗЭ. Вестник МИТХТ 2012;7(6):69–74.
16. Бандуркин Г.А., Джурицкий Б.Ф., Тананаев И.В., Пахомов В.И. Особенности кристаллохимии соединений редкоземельных элементов. М.: Наука, 1984. С. 229.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОГЕЛЕВОЙ ФОРМЫ ЦИСПЛАТИНА НА АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЕ ЗАЙДЕЛЯ

М.Ю. Ревтович¹, Ю.П. Истомин¹, О.В. Красько⁴, Е.М. Трещалина⁶, П.М. Бычковский³, Т.Л. Юркштович²,
А.И. Шмак¹, Н.В. Голуб², В.А. Алиновская², Р.И. Костерова², С.О. Соломевич², Ю.И. Рогов⁵

¹Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова;
Республика Беларусь, 223040 Минск, агрогородок Лесной;

²НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета;
Республика Беларусь, 220030 Минск, ул. Ленинградская, 14;

³Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром БГУ»;
Республика Беларусь, 220108 Минск, ул. Курчатова, 1;

⁴Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси; Республика Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова, 6;

⁵ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;
Республика Беларусь, 220013 Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3;

⁶ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478
Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Михаил Юрьевич Ревтович mihail_revtovich@yahoo.com

Введение. При проведении регионарной интраперитонеальной (внутрибрюшинной) химиотерапии применяются цитостатики в пролонгированной лекарственной форме, в частности, на основе различных биodeградируемых гидрогелей, например фосфата декстрана.

Цель исследования — сравнительная оценка противоопухолевой активности гидрогеля цисплатина (ГГЦП) и цисплатина (ЦП) на асцитной гепатоме Зайделя.

Материалы и методы. На 49 белых нелинейных крысах ($n = 7$) с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайделя изучена противоопухолевая активность пролонгированной лекарственной формы ЦП с гидрогелем фосфата декстрана при однократном внутрибрюшинном введении в диапазоне доз по ЦП от 3 до 8 мг/кг ($\approx$ максимально переносимая доза) в сравнении с фармакопейным ЦП. Об эффективности судили по стандартным критериям: числу крыс без асцита на 32-е сутки опыта (полная ремиссия) и увеличению продолжительности жизни крыс с асцитом (лечение (treatment)/контроль (control), $T/C \geq 125\%$) в сравнении с группами без лечения (контрольная, где $T/C = 100\%$) и лечения ЦП. Использованы методы макроскопического, патоморфологического и статистического анализа результатов.

Результаты. Показано, что ГГЦП в сравнении с неэффективным ЦП был высокоэффективным: полная ремиссия 4/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140–188\%$ против 91–101%, объем асцита $13,6 \pm 6,6$ мл против $50,0 \pm 7,9$ мл ($p = 0,004$) на фоне удовлетворительной переносимости. Регрессионный анализ подтверждает, что ГГЦП в диапазоне доз достоверно улучшает выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя, снижая риск смерти в 7–35 раз и относительный риск при дозе 5,5 мг/кг — в 36 раз (95% доверительный интервал 3,86–327,60; $p = 0,002–0,005$).

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать ГГЦП как перспективный пролонгированный препарат ЦП для интраперитонеальной терапии и рекомендовать его доклиническое изучение.

Ключевые слова: пролонгированная форма цисплатина, гидрогель фосфата декстрана, противоопухолевая активность, сравнительное изучение, асцитная гепатома Зайделя

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-96-101

ANTITUMOR EFFECT OF HYDROGEL CISPLATIN ON ZEJDEL ASCITES HEPATOMA

M. Yu. Reutovich¹, Yu. P. Istomin¹, O. V. Krasko⁴, H. M. Treshalina⁶, P. M. Bychkovsky³, T. L. Yurkshtovich²,
A. I. Shmak¹, N. V. Golub², V. A. Alinovskaya², R. I. Kosterova², S. O. Solomevich², Y. I. Rogov⁵

¹N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus; Lesnoy, Minsk District, 223040, Belarus;

²Research Institute for Physical Chemikal Problem of the Belarusian State University; 14 Leningradskaya str., Minsk, 220030, Belarus;

³Educational and Scientific Production Republican Unitary Enterprise «Unitehprom BSU»; 1 Kurchatova str., Minsk, 220108, Belarus;

⁴United Institute of Informatics Problems National Academy of Sciences of Belarus; 6 Surganova str., Minsk, 220012, Belarus;

⁵Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; 3 building 3 P. Brovki str., Minsk, 220013, Belarus;

⁶N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia

Aims and objectives. During regional intraperitoneal chemotherapy cytostatics in prolonged dosage form, in particular, on the basis of various biodegradable hydrogels, such as dextran phosphate are applied.

Aim of the study – a comparative evaluation of the antitumor activity of cisplatin and cisplatin in prolonged dextran phosphate hydrogel form on Zajdel ascites hepatoma.

Materials and methods. On 49 white no inbreed rats ($n = 7$) with implanted intraperitoneal Zajdel ascites hepatoma the antitumor activity of cisplatin in prolonged dextran phosphate hydrogel form with single intraperitoneal injection of the dosage from 3 to 8 mg/kg ($\approx$ maximum tolerated dose, MTD) was evaluated in comparison with officinal cisplatin. The treatment efficacy was assessed by a statistically significant standard criteria: the absence of ascites by 32nd day of the experiment (complete remission) and an increase in life span of rats with ascites ($T/C \geq 125\%$, «treatment/controls») in comparison with the rats without treatment (tumor growth control, where $T/C = 100\%$) or treated with officinal cisplatin. Macroscopic, pathomorphological and statistical analysis of the results were used.

Results. It has been shown that hydrogel form of cisplatin compared to cisplatin was significantly more effective: complete remission 4/7–6/7 vs 0/7, $T/C = 140–188\%$ vs $91–101\%$, the volume of ascites $13,6 \pm 6,6$ ml vs $50,0 \pm 7,9$ ml ($p = 0,004$) because of a better tolerance. Regression analysis confirms that hydrogel form of cisplatin in used dose range significantly improves the rats survival with Zajdel ascites hepatoma, reducing the risk of death from tumor in 7–35 times and the relative risk with the dose of 5,5 mg/kg in 36 times ($95\% \text{ CI } 3,86 \div 327,60$) ($p = 0,002–0,005$).

Conclusions. The data obtained allow considering the hydrogel form of cisplatin as a promising prolonged this drug form of cisplatin by the intraperitoneal therapy and recommending it to preclinical study.

Key words: prolonged form of cisplatin, dextran phosphate hydrogel, antitumor activity, comparable investigation, Zajdel ascites hepatoma

Введение

При проведении регионарной интраперитонеальной (внутрибрюшинной) химиотерапии применяются цитостатики в пролонгированной лекарственной форме, в частности на основе различных биodeградируемых гидрогелей, например фосфата декстрана [1, 2]. В Республике Беларусь создан оригинальный пролонгированный препарат цисплатин (ЦП) в лекарственной форме с полимером-носителем гелеобразующим фосфатом декстрана или гидрогелем (ГГЦП) [3]. Для экспериментального изучения таких препаратов используют, как правило, внутрибрюшинно трансплантированные опухоли, позволяющие оценить эффективность лечения при прямом контакте с опухолевыми клетками, например, асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) крыс. Настоящее исследование посвящено сравнительной оценке эффективности интраперитонеальной терапии ГГЦП и ЦП на этой опухолевой модели по программе скрининга.

Цель исследования – сравнительная оценка противоопухолевой активности ГГЦП и ЦП на модели АГЗ.

Материалы и методы

Исследование специфической активности ГГЦП проводили на 49 белых нелинейных крысах (масса тела $175,3 \pm 5,62$ г) с перевитой внутрибрюшинно АГЗ (культура получена из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Животных содержали в виварии Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова на стандартной диете в обычном питьевом режиме.

В исследовании использовали АГЗ с малоизученной чувствительностью к ЦП. Опухоль трансплантировали крысам по 0,5 мл 5-дневного асцита от доноров. После трансплантации крыс разделили на группы

по 7 особей в каждой. Действие внутрибрюшинного ЦП на АГЗ практически не описано, но известна относительно низкая чувствительность асцитной опухоли крыс к терапевтической однократной дозе 4 мг/кг [4]. Поэтому в настоящем опыте использовали широкий диапазон доз – от 3 до 8 мг/кг, вплоть до близкой к максимально переносимой дозе (МПД).

Для получения гидрогеля перед применением в образцы добавляли дистиллированную воду. Образцы ГГЦП получали путем добавления водных растворов ЦП заданных концентраций к фосфату декстрана до его набухания. Полученные образцы лиофильно высушивали и стерилизовали радиационным методом (2,5 мрад).

Все агенты вводили крысам однократно внутрибрюшинно через 24 ч после перевивки опухоли в индивидуально рассчитанных дозах (табл. 1). Применяли ГГЦП в диапазоне доз по ЦП 3,0; 5,5 и 8,0 мг/кг в объеме 1,25 мл на 100 г массы тела крысы, количество фосфата декстрана во всех образцах – 500 мг/кг. ЦП (аптечный, УП «Унидрагмет» БГУ, Республика Беларусь) вводили крысам однократно внутрибрюшинно в стерильном физиологическом растворе в дозах 5,5 и 8 мг/кг.

Ранее нами было показано, что кинетика высвобождения ЦП из фазы гидрогеля в фосфатный буферный раствор, имитирующий биологическую среду (определяли по методу Ю.М. Самченко, З.Р. Ульберг, 1996 [5]), при температуре 37°C имеет двухфазный характер:

- 1-я фаза (30–45 мин) – десорбция ЦП до 40–45 % из приповерхностных областей гидрогеля до «ударной» концентрации цитостатика;
- 2-я фаза (240 мин) – десорбция ЦП до 55–60 % с первоначально высокой скоростью в течение первого часа.

Таблица 1. Группы крыс и дозы препаратов

№	Группа	Доза по ЦП, мг/кг
1	КРО	—
2	ГГЦП*	3,0
3	ГГЦП	5,5
4	ГГЦП	8,0
6	ЦП	5,5
7	ЦП	8,0**

Примечание. ЦП — цисплатин, ГГЦП — гидрогелевая форма цисплатина, КРО — контроль роста опухоли. * Доза фосфата декстрана 500 мг/кг; ** $\approx$ максимально переносимая доза.

Соответственно практически полное высвобождение ЦП из ГГЦП достигается в течение $\approx 5,5$ ч. Окончательная биodeградация полимера с постоянным уменьшением скорости десорбции на низком уровне реализуется в течение 32 сут (срок, определенный для умерщвления крыс без асцита).

Для оценки противоопухолевого эффекта использованы стандартные критерии [6]:

- полная ремиссия (ПР) — отсутствие асцита в течение 32 дней после перевивки, определяется под контролем аутопсии и патоморфологической картины брюшной полости;
- увеличение продолжительности жизни, определенное по соотношению средней продолжительности жизни (СПЖ, дни) в леченой (treatment, T) и контрольной (control, C) группах ($T/C \geq 125$ % (в группе КРО $T/C = 100$ %)).

Значимость различий между показателями эффективности оценивали с помощью логрангового критерия с поправкой Бонферрони на множественные сравнения с учетом слабой мощности критерия Стьюдента [7, 8]. Для оценки снижения рисков использовали модель пропорциональных рисков Кокса, о значимости влияния фактора риска (исследуемых препаратов) на выживаемость судили по критерию Вальда [9]. На основе коэффициентов регрессии рассчитывали снижение относительного риска (ОР), для чего вычисляли обратные экспоненцированные значения коэффициентов регрессии и доверительные интервалы (ДИ) на основе соответствующих ДИ коэффициентов регрессии аналогичным образом. Анализ данных выполнен с использованием статистического пакета R V. 3.1.1 (лицензия GPL) [10]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Павших и выведенных из эксперимента после его завершения (32-е сутки) животных подвергали аутопсии для морфологической оценки изменений внутренних органов на фоне различных вариантов терапии.

Исследования проводили в соответствии с техническим кодексом «Надлежащая лабораторная

практика» (утв. постановлением Минздрава Республики Беларусь от 28.03.2008 № 56) и международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 2000 г.).

Результаты и обсуждение

Показано, что при СПЖ $6,4 \pm 0,8$ дня у крыс контрольной группы применение ГГЦП приводило к полному дозозависимому подавлению развития асцита: ПР 3/7 при дозе (по ЦП) 3 мг/кг и ПР 6/7 при дозе 5,5 мг/кг. Относительное уменьшение эффективности по этому критерию при близкой к МПД дозе 8 мг/кг до ПР 4/7 связано с единичной гибелью крыс раньше, чем в контроле.

Увеличение продолжительности жизни крыс с асцитом в группах ГГЦП было также дозозависимым и при дозе 3 мг/кг (по ЦП) достигло $T/C = 188$ %. При дозе 5,5 мг/кг у всех крыс, кроме одной, не показавшей эффекта по СПЖ, достигнута ПР. Относительное уменьшение СПЖ при близкой к МПД дозе 8 мг/кг до $T/C = 140$ % также связано с единичной гибелью крыс раньше контроля.

Сравнение эффективности ГГЦП и ЦП в диапазоне изученных доз по обоим показателям показало существенный терапевтический выигрыш: ПР 3/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140$ –188 % против 91–101 %. Выявленные различия высокодостоверны (табл. 2), подробный статистический анализ результатов приведен ниже.

С помощью тестов установлено, что после применения ГГЦП в диапазоне изученных доз выживаемость крыс статистически значимо дозозависимо возрастала по сравнению с контролем: $p_{\log\text{-rank}} = 0,000178$ (рис. 1, правое поле), в то время как терапия ЦП не улучшала показатели кумулятивной выживаемости: $p_{\log\text{-rank}} > 0,05$ (рис. 1, левое поле).

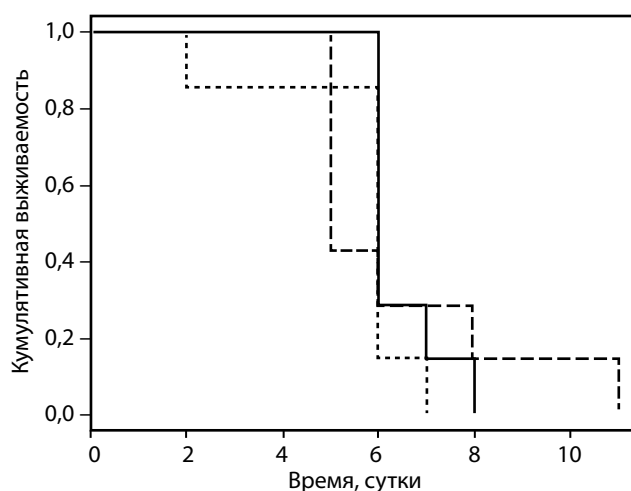
Использование модели пропорциональных рисков Кокса позволило оценить ОР и установить, что применение ГГЦП снижало риск летального исхода в 7–36 раз по сравнению с контрольной группой, причем при дозе 5,5 мг/кг получен лучший результат — снижение ОР в 36 раз (95 % ДИ 3,86–327,60). Терапия ЦП независимо от дозы не снижала риск наступления летального исхода в результате прогрессии опухоли (табл. 3).

По данным аутопсии у крыс контрольной группы на 8-е сутки в брюшной полости накапливалось $50,0 \pm 7,9$ мл геморрагического асцита с формированием конгломерата (большой сальник, тонкая кишка, брыжейка), местами на висцеральной брюшине отмечено формирование диссеминатов. Микроскопически отмечено формирование в брюшине псевдожелезистых структур, имеющих различные размеры и форму

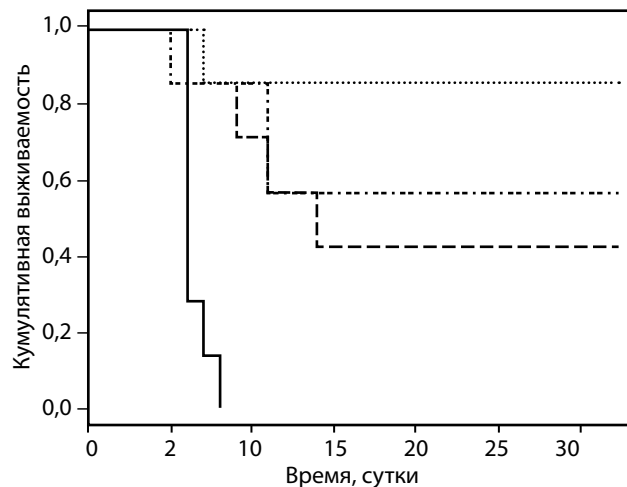
Таблица 2. Сравнительная эффективность применения гидрогелевой формы цисплатина и цисплатина на модели асцитной гепатомы Зайделя

Группа	Доза по ЦП, мг/кг	Показатель эффективности				p			
		Сроки гибели крыс, дни	СПЖ павших животных, дни	T/C, %*	ПР****	Критерий Стьюдента	Критерий Даннета	Критерий Фишера	Log-rank-тест с поправкой Бонферрони
КРО	—	6, 6, 6, 6, 6, 7, 8 (n = 7)	6,4 ± 0,8	100	—	—	—	—	—
ГГЦП	3,0	10, 10, 11, 14 (n = 4)	11,3 ± 1,89	188***	3/7****	0,0001	0,063	0,192	0,006
ГГЦП	5,5	7 (n = 1)	7,0	—	6/7****	—	—	0,005	0,003
ГГЦП	8,0	5, 11, 11 (n = 3)	9 ± 3,5**	140***	4/7****	0,080	0,356	0,007	0,019
ЦП	5,5	5, 5, 5, 6, 6, 8, 11 (n = 7)	6,5 ± 2,2**	101	0/7	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
ЦП	8,0	3, 6, 6, 6, 6, 6, 7 (n = 7)	5,7 ± 1,3**	91	0/7	0,232	0,934	> 0,99	> 0,99

Примечание. ЦП — цисплатин, ГГЦП — гидрогелевая форма цисплатина, КРО — контроль роста опухоли, СПЖ — средняя продолжительность жизни. * Соотношение СПЖ в леченой и контрольной группах; ** единичная гибель на 3-и или 6-е сутки после трансплантации; *** различия с контролем и группами ЦП достоверны, $p < 0,05$; **** полная ремиссия, крысы без асцита на 32-е сутки опыта.



— Контроль
 - - - Цисплатин, 5,5 мг/кг
 - · - · - Цисплатин, 8 мг/кг



— Контроль
 - - - Цисплатин, 3 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг
 - · - · - Цисплатин, 5,5 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг
 · · · · Цисплатин, 8 мг/кг + фосфат декстрана 500 мг/кг

Рис. 1. Выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогелевой формы цисплатина (правое поле) или цисплатина (левое поле) в диапазоне доз

(рис. 2а). В группах ГГЦП объем и степень поражения брюшной полости были существенно меньше: объем асцита до $13,6 \pm 6,6$ мл (в сравнении с контрольной группой, $p = 0,004$) с формированием единичных плоскостных спаек между петлями тонкой кишки, а у крыс с ПР патологические изменения отсутствовали вплоть до 31-х суток опыта (рис. 2б). В группах ЦП объем асцита достигал $62,9 \pm 9,2$ мл с развитием спаечного процесса аналогично контрольной группе. Микроскопически в париетальной и висцеральной брюшине имело место массивное разрастание злокачественной опухоли солидного и аденокарциноматозного строения (13-е сутки эксперимента) (рис. 2в).

Анализ полученных данных прежде всего показал, что АГЗ практически нечувствительна к внутрибрюшинной однократной терапии ЦП во всем диапазоне переносимых доз, вплоть до близкой к МПД. ГГЦП с пролонгированным высвобождением ЦП в зоне роста опухоли в течение 5,5 ч и полной деградацией геля до 32 дней при внутрибрюшинной однократной терапии в дозах по ЦП от 3 до 8 мг/кг дозозависимо реализует значимую эффективность по всем использованным критериям:

- длительное (до 32 дней) и избирательное (без серьезных осложнений) подавление продукции асцита у большей части крыс в группе;

Таблица 3. Относительный риск наступления летального исхода в результате прогрессирования асцитной гепатомы Зайделя у крыс в группах сравнения эффективности гидрогелевой формы цисплатина и цисплатина

Препарат	Доза, мг/кг	Статистики регрессионного анализа			p
		коэффициент регрессии β	стандартная ошибка	снижение ОР, (95 % ДИ)	
ГГЦП	3,0	–2,01	0,71	7,45 (1,84–30,24)	0,005
	5,5	–3,57	1,13	35,56 (3,86–327,60)	0,002
	8,0	–2,32	0,78	10,18 (2,22–46,67)	0,003
ЦП	5,5	–0,04	0,56	1,04 (0,34–3,12)	0,945
	8,0	0,34	0,54	0,71 (0,25–2,05)	0,529

Примечание. ЦП – цисплатин, ГГЦП – гидрогелевая форма цисплатина, ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал.

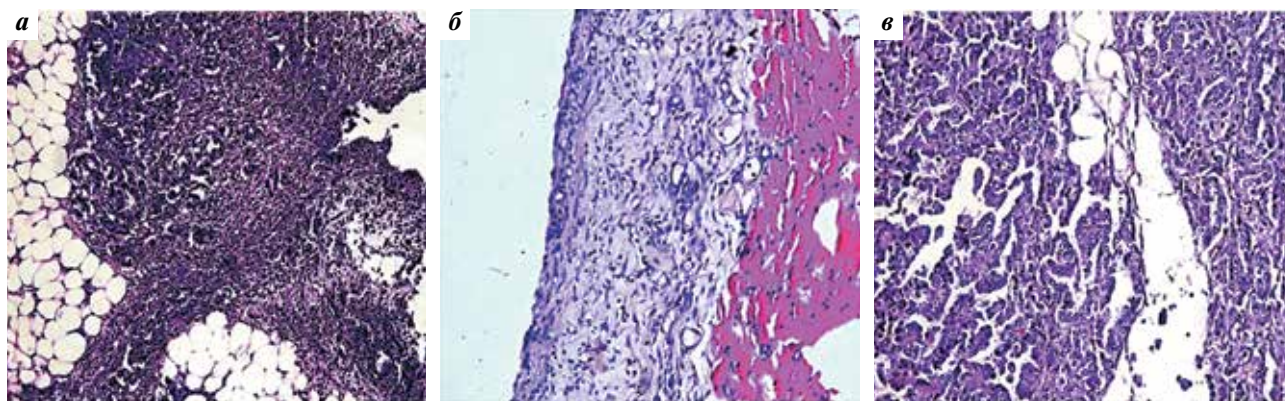


Рис. 2. Морфологические изменения в большом сальнике и париетальной брюшине у крыс с асцитной гепатомой Зайделя: а – без лечения, б – после применения цисплатина, в – после применения гидрогеля цисплатина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

- верифицированное уменьшение или прекращение имплантационной диссеминации по брюшине (канцероматоз);
- значимое достоверное пролонгирование жизни части крыс с асцитом до 56 %.

Полученные эффекты расценены как следствие длительного локального удержания относительно высокой концентрации ЦП, что является целью эффективной интраперитонеальной химиотерапии [11].

Заключение

На 49 белых нелинейных крысах ($n = 7$) с перевитой внутрибрюшинно гепатомой Зайделя изучена противоопухолевая активность ГГЦП при однократном внутрибрюшинном введении в диапазоне доз по ЦП от 3 до 8 мг/кг ($\approx$ МПД) в сравнении с ЦП. Об эффективности судили по стандартным критериям: числу крыс без асцита на 32-е сутки опыта (ПР) и увеличению

продолжительности жизни крыс с асцитом ($T/C \geq 125$ %) в сравнении с группами без лечения (контрольная, где $T/C = 100$ %) и ЦП. Использованы методы макроскопического, патоморфологического и статистического анализа результатов. Показано, что ГГЦП в сравнении с неэффективным ЦП был высокоэффективным: ПР 4/7–6/7 против 0/7, $T/C = 140$ –188 % против 91–101 %, объем асцита $13,6 \pm 6,6$ мл против $50,0 \pm 7,9$ мл ($p = 0,004$) на фоне удовлетворительной переносимости. Регрессионный анализ подтверждает, что ГГЦП в диапазоне доз достоверно улучшает выживаемость крыс с АГЗ, снижая риск смерти в 7–36 раз и ОР при дозе 5,5 мг/кг – в 36 раз (95 % ДИ 3,86–327,60; $p = 0,002$ –0,005). Полученные данные позволяют рассматривать ГГЦП как перспективный пролонгированный препарат ЦП для интраперитонеальной терапии и рекомендовать его доклиническое изучение.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Soma D., Kitayama J., Konno T. et al. Intraperitoneal administration of paclitaxel solubilized with poly (2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* 2009;100(10):1979–85. DOI: 10.1111/j.1349–7006.2009.01265.x. PMID: 19604244.
2. Wang Y., Gong Ch., Yang L. et al. 5-FU-hydrogel inhibits colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice [Электронный ресурс]. *BMC Cancer* 2010;10:402. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/402>. Дата доступа: 16.08.2010. DOI: 10.1186/1471-2407-10-402. PMID: 20678220. PMCID: PMC2920883.
3. Юркштович Т.Л., Голуб Н.В., Костерова Р.И., Алиновская В.А. Фосфаты крахмала и декстрана: получение и возможность использования в медицинских целях. Тезисы доклада на XXIII Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии», 27–29 октября 2010 г. Минск, 2010. С. 42.
4. Bepalov V.G., Belyaeva O.A., Kireeva G.S. et al. Dioxadet and Cisplatin Anti-Tumor Activity Increase in Hyperthermic Intraperitoneal Chemoperfusion on Advanced Ovarian Carcinoma Model. *J Modern Technologies in Medicine ser Biomed Invest* 2014;6(4):48–52.
5. Самченко Ю.М., Ульберг З.Р. Специфические взаимодействия полиэлектролитных гидрогелей с антиглаукомными лекарственными средствами. *Коллоидный журнал* 1996;58(2):240–3.
6. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.
7. Bate S.T., Clark R.A. The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments. Cambridge University Press 2014:234–7.
8. Festing M.F.W., Altman D.G. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR J* 2002;43(4):244–58.
9. Therneau T., Grambsch P. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Springer-Verlag, 2000. 350 p.
10. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: <http://www.R-project.org/>. Date of access: 01.11.2014.
11. Давыдов М.И., Тер-Ованесов М.Д., Буйденко Ю.В. и др. Гипертермическая интраоперационная интраперитонеальная химиотерапия при раке желудка: существует ли реальная возможность изменить прогноз? *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2010;21(1):11–9.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ КИНАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНА *BCR-ABL* У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

А.В. Мисюрин^{1,2}, Е.Н. Мисюрина³, В.В. Тихонова¹, А.А. Крутов², Л.А. Кесаева¹, Ю.П. Финашутина¹, В.А. Мисюрин¹, Н.Н. Касаткина¹, Е.А. Османов¹, А.Г. Туркина⁴, Е.Ю. Челышева⁴, **А.Ю. Барышников¹**

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104;

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 123182 Москва, ул. Пехотная, 3;

⁴ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Андрей Витальевич Мисюрин cyclon@nm.ru

Введение. Мутации гена *BCR-ABL* являются основной причиной резистентности больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) к иматинибу — ингибитору тирозинкиназ 1-го поколения (ИТК-1). Некоторые из этих мутаций могут приводить также и к резистентности к нилотинибу и дазатинибу — ингибиторам тирозинкиназ 2-го поколения (ИТК-2), причем наборы мутаций для этих препаратов различны. В связи с тем что ИТК-2 применяют для лечения больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, для корректного назначения этих препаратов необходимо знать частоту появления разных видов мутаций гена *BCR-ABL*.

Цель исследования — определить частоту встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу.

Материалы и методы. Мутации гена *BCR-ABL* исследовали в крови больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, методом прямого секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции по Сэнгеру.

Результаты. Мутации гена *BCR-ABL* были выявлены у 31 % ($n = 262/846$) больных ХМЛ. Доля всех мутаций, перекрестно резистентных как к иматинибу (ИТК-1), так и к препаратам 2-й линии (ИТК-2), составила для нилотиниба 40,3 %, для дазатиниба — 21 %.

Выводы. Более половины мутаций гена *BCR-ABL*, обнаруженных у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, вызывают также и резистентность к одному или другому препарату ИТК-2. В связи с этим при смене терапии с ИТК-1 на ИТК-2 у резистентных к ИТК-1 больных ХМЛ проведение мутационного анализа является обязательным, так как при случайном назначении этих препаратов высока вероятность, что они могут оказаться неэффективными.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, резистентность к иматинибу, мутация гена *BCR-ABL*

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-102-109

BCR-ABL GENE KINASE DOMAIN MUTATION FREQUENCY IN IMATINIB RESISTANT CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

A.V. Misyurin^{1,2}, E.N. Misyurina³, V.V. Tichonova¹, A.A. Krutov², L.A. Kesaeva¹, Yu.P. Finashutina¹, V.A. Misyurin¹, N.N. Kasatkina¹, E.A. Osmanov¹, A.G. Turkina⁴, E.Yu. Chelysheva⁴, **A.Yu. Baryshnikov¹**

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Sh., Moscow, 115478, Russia;

²GeneTechnology LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow, 117485, Russia;

³City Clinical Hospital No. 52, 3 Pekhotnaya St., Moscow, 123182, Russia;

⁴National Research Center for Hematology at the Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy proezd, Moscow, 109202, Russia

Background. *BCR-ABL* gene mutations are the main cause of tyrosine kinase 1st generation inhibitor (TKI-1) imatinib resistance in chronic myelogenous (CML) patients. Some of them are resistant both for imatinib and TKI-2. The nilotinib and dasatinib mutation spectra are not the same. To ensure a correct choice of TKI-2 for imatinib CML resistant patient treatment it is necessary to investigate frequency of *BCR-ABL* gene mutations.

Aim. To evaluate *BCR-ABL* gene mutation frequency in imatinib resistant CML patients.

Materials and methods. Peripheral blood of imatinib resistant CML patients were studied by means of direct PCR product Sanger sequencing in order to reveal *BCR-ABL* gene mutations.

Results. *BCR-ABL* gene mutations were found in 31 % ($n=262/846$) imatinib resistant patients. Proportion of resistant mutations were 40,3 % for nilotinib and 21 % for dasatinib.

Conclusion. More than a halve of BCR-ABL mutations resistant for imatinib were resistant either against nilotinib or dasatinib. Consequently, prior to replace imatinib for nilotinib or dasatinib it is necessary to perform BCR-ABL mutational analysis. If to prescribe TKI-2 blindly there may be high risk that nilotinib or dasatinib would be ineffective due to improper mutation in BCR-ABL gene.

Key words: chronic myelogenous, imatinib resistance, BCR-ABL gene mutation

Введение

Основной причиной резистентности больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) к терапии иматинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) являются мутации, затрагивающие участок между экзонами а3 и а11 гена *ABL*, которые входят в состав химерного онкогена и соответствующей мРНК *BCR-ABL* [1–3]. Согласно рекомендациям Европейской сети по изучению лейкозов (European Leukemia Net) определение первичной последовательности этого участка мРНК *BCR-ABL* является обязательным анализом для всех больных ХМЛ с недостаточным первичным ответом на терапию иматинибом [4]. Данный вид диагностики необходим также в любой момент терапии ХМЛ иматинибом при появлении признаков потери ответа на этот препарат [5, 6]. Кроме того, такой анализ обязателен при переходе на терапию nilotinibом и dasatinibом, так как спектр мутаций *BCR-ABL*, чувствительных к этим препаратам, различен. Известно, что nilotinib не действует в случае возникновения мутаций E255K/V, F359C/V и Y253H, а для dasatinibа резистентными мутациями являются T317L и F317I. Кроме того, оба препарата не действуют при появлении мутации T315I [7]. **Цель исследования** – определить частоту встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу. В сообщении приводятся данные о частоте встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, в течение длительного времени наблюдавшихся в различных гематологических клиниках России.

Материалы и методы

В исследование включены 846 больных ХМЛ с признаками резистентности к терапии иматинибом, находившихся под наблюдением в 68 клиниках 53 городов России в период с января 2006 г. по март 2012 г. (74 мес). Больные находились в различных фазах заболевания, эффективность терапии иматинибом контролировалась при помощи количественной оценки экспрессии гена *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с применением Международной шкалы IS [8–10]. Мутационный анализ участка мРНК *BCR-ABL* между экзонами а3 и а11 проводился методом прямого секвенирования.

Выделение ядродержащих клеток из крови. Периферическую кровь брали в объеме 10 мл, используя

в качестве антикоагулянта 0,5 мл 6 % этилендиаминтетрауксусную кислоту (этилендиаминтетраацетат, ЭДТА), или в объеме 9 мл при помощи пробирок VACUETTE®. На следующем этапе проводили избирательный лизис эритроцитов, смешивая кровь с 1/10 объема 0,8 % хлорида аммония и выдерживая 2 мин во льду. Нелизированные ядерные клетки осаждали при 1500 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант сливали, процедуру повторяли еще раз. Осадок ресуспендировали в 2,0 мл раствора STE (10 mM трис-НCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0) и повторяли осаждение. Полученные ядерные клетки использовали для выделения РНК.

Выделение РНК. РНК выделяли из ядерных клеток крови быстрым лизисом в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей фенольной обработкой [11]. Ядерные клетки крови (костного мозга) выделяли, как описано выше, и лизировали в 50 мкл буфера следующего состава: 4,0 M гуанидин-изотиоцианат, 25 mM цитрат натрия, pH 7,0; 0,5 % лаурил саркозил, 0,1 M 2-меркапроэтанол. Добавляли 1/10 объема 2 M ацетата натрия, pH 4,0, 50 мкл насыщенного DEPC-обработанной водой фенола и 20 мкл хлороформа с изоамиловым спиртом (49: 1). Смесь встряхивали на шейкере и помещали на 15 мин в лед, после чего центрифугировали при 4 °С 10 мин при 10000 g. Верхнюю водную фазу еще раз экстрагировали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (24:24:1), насыщенной водным раствором 10 mM Трис-НCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0. Водную фазу смешивали с 50 мкл изопропанола и выдерживали не менее 4 ч при –20 °С. Центрифугировали при 10000 g 10 мин при 25 °С и получали осадок РНК. Этот осадок растворяли в буфере TE, сделанном на DEPC-обработанной воде; вновь осаждали РНК 3 объемами 98 % этанола в присутствии 0,5 M NaCl. Качество полученной РНК оценивали электрофорезом в 1,6 % агарозном геле. Пригодными для дальнейшего анализа считали те образцы, которые давали характерную картину распределения пиков рРНК и тРНК.

Обратно-транскриптная реакция (ОТ). Реакционная смесь ОТ при синтезе кДНК содержала в общем объеме 25 мкл 2,0 мкг РНК, 4 основных dNTP в концентрации 1 mM по каждому, 10 нмоль праймера R-ABLMut1 (5'-TGA GGC ATC TCA GGC ACG TC-3'), 50 mM Трис-НCl, pH 8,3, 75 mM хлорида калия, 3,0 mM хлорида магния, 10 mM дитиотреитола, 40 ед. ингибитора РНКаз RNAsin (Promega, США),

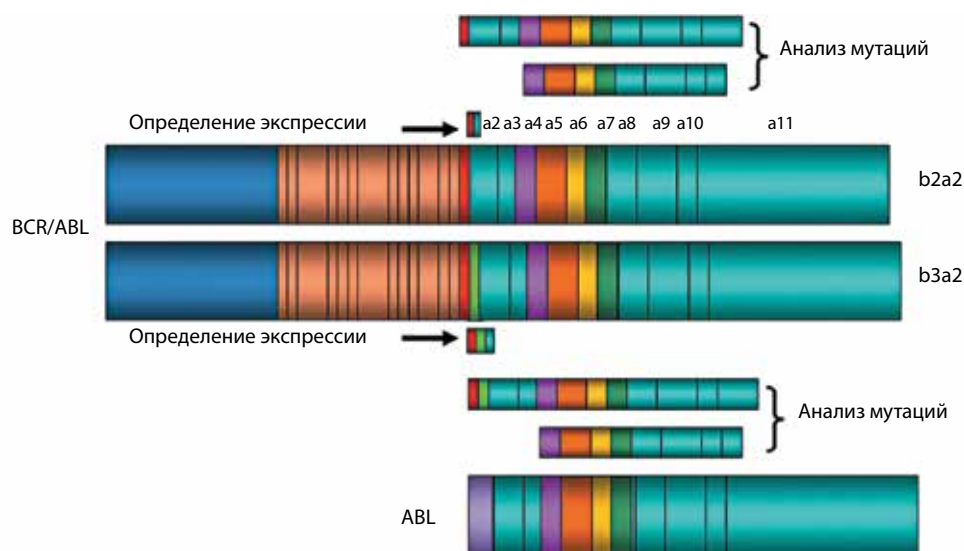


Рис. 1. Схема ПЦР-амплификации кДНК гена BCR-ABL для проведения мутационного анализа

200 ед. ревертазы M-MLV (Promega, США). При составлении реакционной смеси использовали 5-кратный буфер для обратной транскрипции (Promega, США). Инкубировали при 37 °C в течение 45 мин, затем прогревали 2 мин при 94 °C для остановки реакции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). После получения кДНК следовало 2 раунда ПЦР (ПЦР-1 и ПЦР-2). Для ПЦР-1 использовали в качестве матрицы 1/10 объема реакционной смеси после ревертазной реакции, которая содержала кДНК, а для ПЦР-2—1/10 реакционной смеси после ПЦР-1. Праймеры для ПЦР были подобраны таким образом, чтобы при проведении ПЦР-1 избирательно амплифицировалась последовательность кДНК гена BCR-ABL, а кДНК нормального гена ABL не амплифицировалась (рис. 1). ПЦР-1 проводили с привлечением внешних праймеров 5 BCR и R-ABLMut1, а для ПЦР-2 применяли внутренние праймеры F-ABLMut и R-ABLMut2. Условия ПЦР-1 и ПЦР-2: денатурация 94 °C — 30 с, отжиг — 60 °C, синтез — 72 °C, 30 циклов. Продукты ПЦР анализировали и очищали с использованием 10 % полиакриламидного геля.

Праймеры для ПЦР-1:

5 BCR 5'-GAA-GCT-TCT-CCC-TGA-CAT-CCG-T-3'

R-ABLMut1 5'-TGA GGC ATC TCA GGC ACG TC-3'.

Праймеры для ПЦР-2:

F-ABLMut 5'-GCA-AGC-TCT-ACG-TCT-CCT-CC-3'

R-ABLMut2 5'-AAG-GTA-GTC-ACA-GCC-CCA-CG-3'.

Секвенирование. Секвенирование проводили с использованием набора реактивов BigDye Terminator

3.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) с учетом рекомендаций производителя. Для секвенирующей реакции в прямом направлении использовали праймер F-ABLMut, в обратном — R-ABLMut2. После проведения секвенирующих реакций продукты ПЦР очищали при помощи набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Мутации гена BCR/ABL были выявлены у 31 % ($n = 262$) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, среди которых было 59,9 % мужчин ($n = 157$) и 40,1 % женщин ($n = 105$), медиана возраста — 50 (от 15 до 74) лет. Поскольку у 5,7 % ($n = 16$) больных были выявлены двойные мутации, то общее количество обнаруженных у 262 больных мутаций составило 278. Обнаружены 40 различных вариантов мутаций, они перечислены в порядке убывания частоты встречаемости, рассчитанной по данным настоящего исследования, с указанием аминокислотных замен: T315I (35/278—12,6 %), G250E (35/278—12,6 %), T317L (22/278—7,9 %), M244V (21/278—7,6 %), F359V (18/278—6,5 %), H396R (18/278—6,5 %), Y253H (18/278—6,5 %), E255K (16/262—5,8 %), E255V (11/278—3,9 %), L248V (11/278—3,9 %), M315T (11/278—3,9 %), E355G (8/278—2,9 %), F359C (7/278—2,5 %), del ex7 (5/278—1,8 %), Q252H (5/278—1,8 %), L387F (5/278—1,8 %), S348L (4/278—1,4 %), Ins 98—72 bp (3/278—1,1 %), F317I (3/278—1,1 %), E255D (3/278—1,1 %), E275K (2/278—0,7 %), E279A (2/278—0,7 %), K247R (2/278—0,7 %), L387M (2/278—0,7 %), V299A (2/278—0,7 %), E292V (1/278—0,3 %), E334G

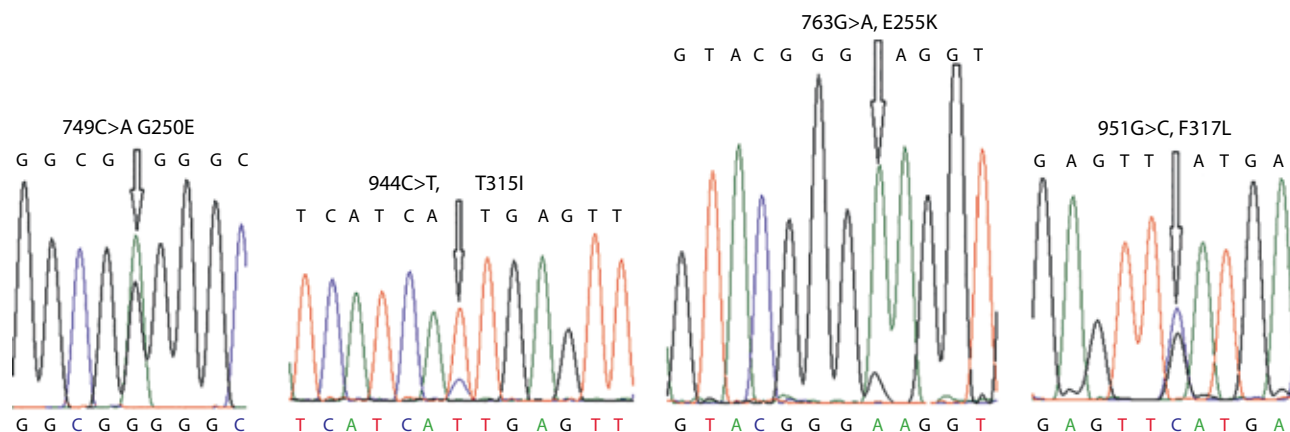


Рис. 2. Примеры обнаруженных мутаций гена *BCR-ABL*: G250E (749G>A) – резистентна к иматинибу, чувствительна к нилотинибу и дазатинибу; T315I (944C>T) – резистентна к иматинибу, нилотинибу и дазатинибу; E255K – резистентна к иматинибу и нилотинибу, чувствительна к дазатинибу; F317L (951G>C) – резистентна к иматинибу и дазатинибу, чувствительна к нилотинибу

(1/278–0,4 %), E450K (1/278–0,4 %), E459A (1/278–0,4 %), E459K (1/278–0,4 %), F359I (1/278–0,4 %), F486S (1/278–0,4 %), L383F (1/278–0,4 %), P441L (1/278–0,4 %), Q252M (1/278–0,4 %), Q491L (1/278–0,4 %), T305I (1/278–0,4 %), T345I (1/278–0,4 %), Y312C (1/278–0,4 %), T520S (1/278–0,4 %), G425Stop (1/278–0,4 %). Примеры обнаруженных мутаций приведены на рис. 2. Среди двойных мутаций преобладали мутации, затрагивающие особо значимый для возникновения резистентности к иматинибу домен Р-петли (табл. 1, рис. 3).

Помимо точечных мутаций, приводящих к единичным аминокислотным заменам, в нашем исследовании были обнаружены мутации, приводящие к более существенным изменениям структуры белка *BCR-ABL*: делеция 81 п. н. 3'-конца экзона $\alpha 4$ (рис. 4), инсерция Ins 98–72 bp (встраивание фрагмента длиной 35 п. н. между экзонами 8 и 9) (рис. 5), del ex7 (делеция экзона 7 из состава мРНК *BCR-ABL*, рис. 6), а также мутация G425Stop, приводящая к появлению стоп-кодона в средней части гена *BCR/ABL*. Эти мутации приводят к появлению укороченных молекул белка *BCR-ABL*, устойчивых к действию препаратов ИТК. Обнаруженные нами делеции связаны с появлением криптоических сайтов сплайсинга, а инсерция возникает потому, что активируется небольшой потенциальный экзон, расположенный в средней части 8-го интрона, который по неизвестным причинам обычно не распознается аппаратом сплайсинга.

Медиана срока возникновения мутаций составила 27 (от 3 до 83) мес. Распределение мутаций по стадиям заболевания: хроническая фаза (ХФ) – 49,3 % ($n = 129/262$), фаза акселерации (ФА) – 29,8 % ($n = 78/262$), бластный криз (БК) – 20,9 % ($n = 55/262$). Среди них распределение мутаций, резистентных к нилотинибу и дазатинибу (ИТК 2-й линии), было следующим. Устойчивая к нилотинибу и к дазатинибу

Таблица 1. Двойные мутации гена *BCR-ABL*, выявленные у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу

№	1-я мутация	Зона	2-я мутация	Зона
1	T315I	B	E255V	P-loop
2	E255V	P-loop	F359V	A-loop
3	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
4	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
5	T315I	B	L248V	P-loop
6	M351I	C-domain	S348L	C-domain
7	M244V	P-loop	K247R	P-loop
8	M244V	P-loop	G2S0E	P-loop
9	M244V	P-loop	G250E	P-loop
10	M244V	P loop	F317L	B
11	M244V	P-loop	G250E	P-loop
12	M244V	P-loop	T315I	B
13	M244V	P-loop	M351T	C-domain
14	F359V	A-loop	H396R	A-loop
15	G250E	P-loop	E255K	P-loop
16	S348L	C-domain	M351T	C-domain

Примечание. Красный цвет – резистентны к нилотинибу, синий – к дазатинибу, T315I – ко всем ингибиторам тирозинкиназ 1-го и 2-го поколения

T315I: ХФ – 5,6 %, ФА – 16 %, БК – 27 %. Устойчивые к нилотинибу E255V/K/D: ХФ – 6,2 %, ФА – 12,8 %, БК – 16,4 %; F359V/C/I: ХФ – 9,3 %, ФА – 7,7 %, БК – 2,7 %; Y253H: ХФ – 5,4 %, ФА – 8,9 %, БК – 7,3 %. Устойчивая к дазатинибу F317L/I: ХФ – 4,6 %, ФА – 12,8 %, БК – 16,4 %. Доля всех мутаций, устойчивых к ИТК 2-й линии (с учетом T315I), составила для

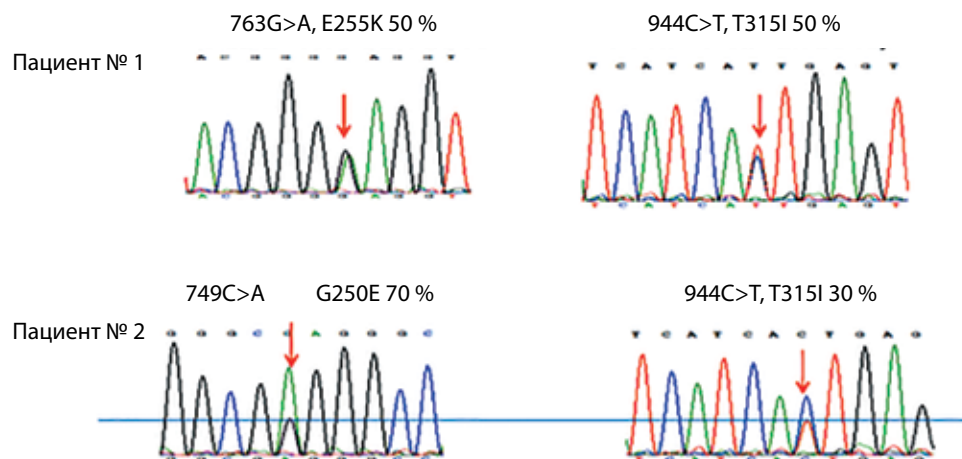


Рис. 3. Примеры обнаружения двойных мутаций гена *BCR-ABL* у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу. Для пациента № 2 показано, что снижение чувствительности методики в 2 раза могло бы привести к ложноотрицательному ответу по критически значимой мутации *T315I*, резистентной ко всем препаратам — ингибиторам тирозинкиназ 2-го поколения

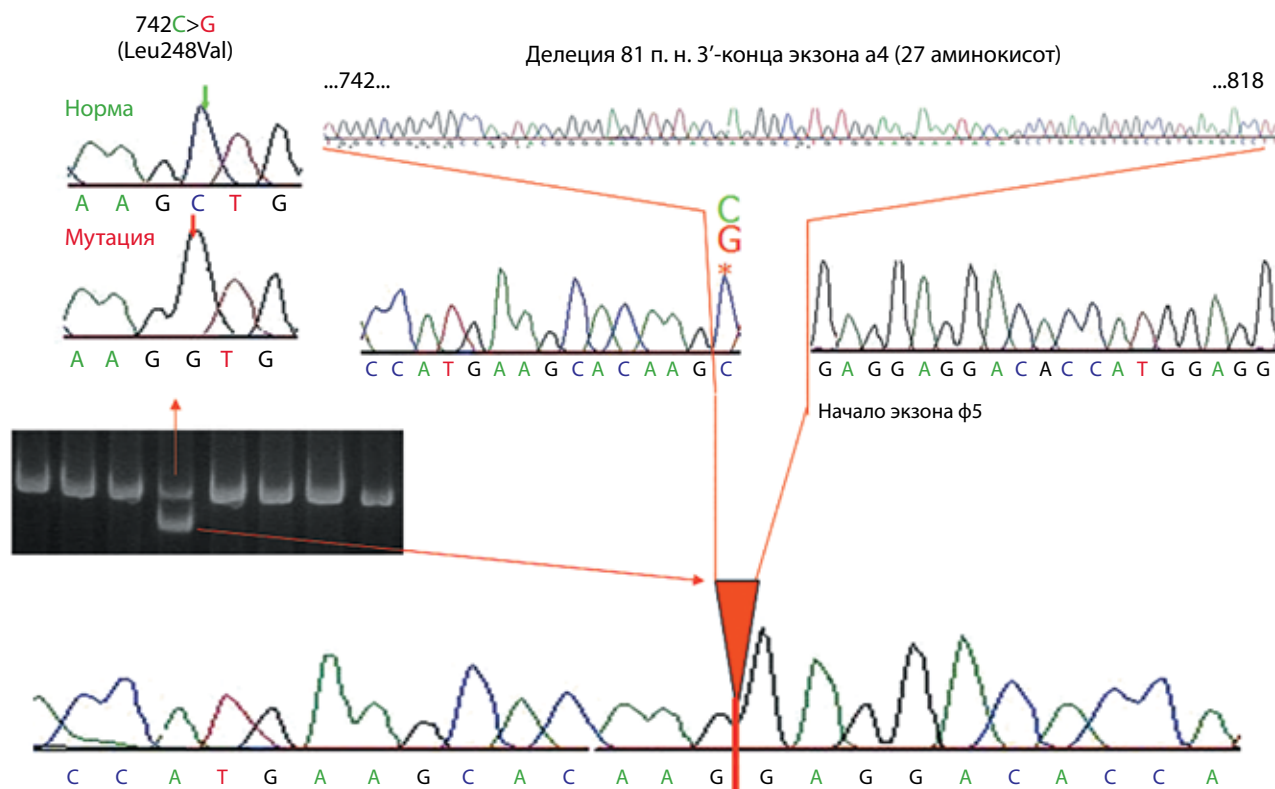


Рис. 4. Мутация с. 742C>G (р. L248V) приводит к появлению криптического сайта сплайсинга, в результате которого происходит делеция 81 п. н. 3' — конца экзона *a4*

нилотиниба 40,3 %, для дазатиниба — 21 % (табл. 2). При смене терапии на препараты ИТК-2 у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, наблюдалось эффективное подавление клона, несущего мутацию, с которой связана резистентность к ИТК-1 (рис. 7). У 69 % ($n = 584$) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, мутации *BCR/ABL* не обнаружены. В этой группе доля мужчин составила 46 % ($n = 268$),

женщин — 54 % ($n = 316$), медиана возраста — 51 год (от 24 до 74 лет). Любопытно, что число женщин в группе резистентных больных ХМЛ без мутаций было выше, чем в группе с выявленными мутациями (54,0 % против 40,1 %, $p = 0,028$). Частота мутаций, выявленная нами у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, близка к тем, которую описывают авторы из других стран [6, 7], однако в других работах

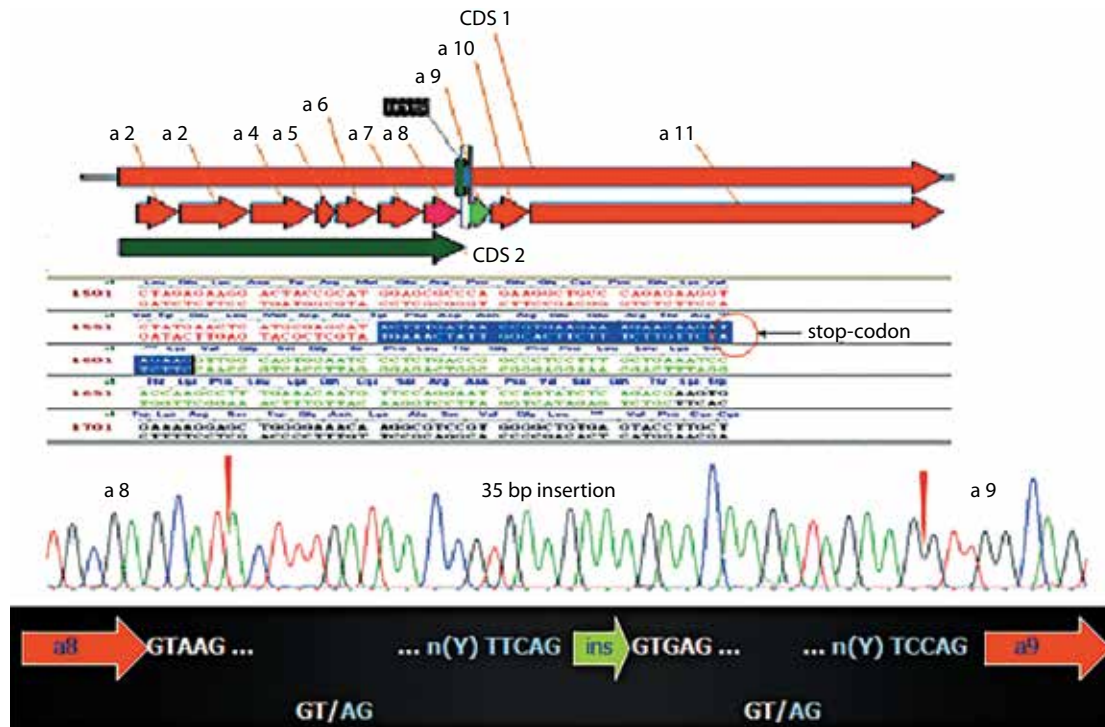


Рис. 5. Инсерция 35 п. н. между экзонами a8 и a9 гена BCR-ABL у больного хроническим миелолейкозом с первичной резистентностью к иматинибу

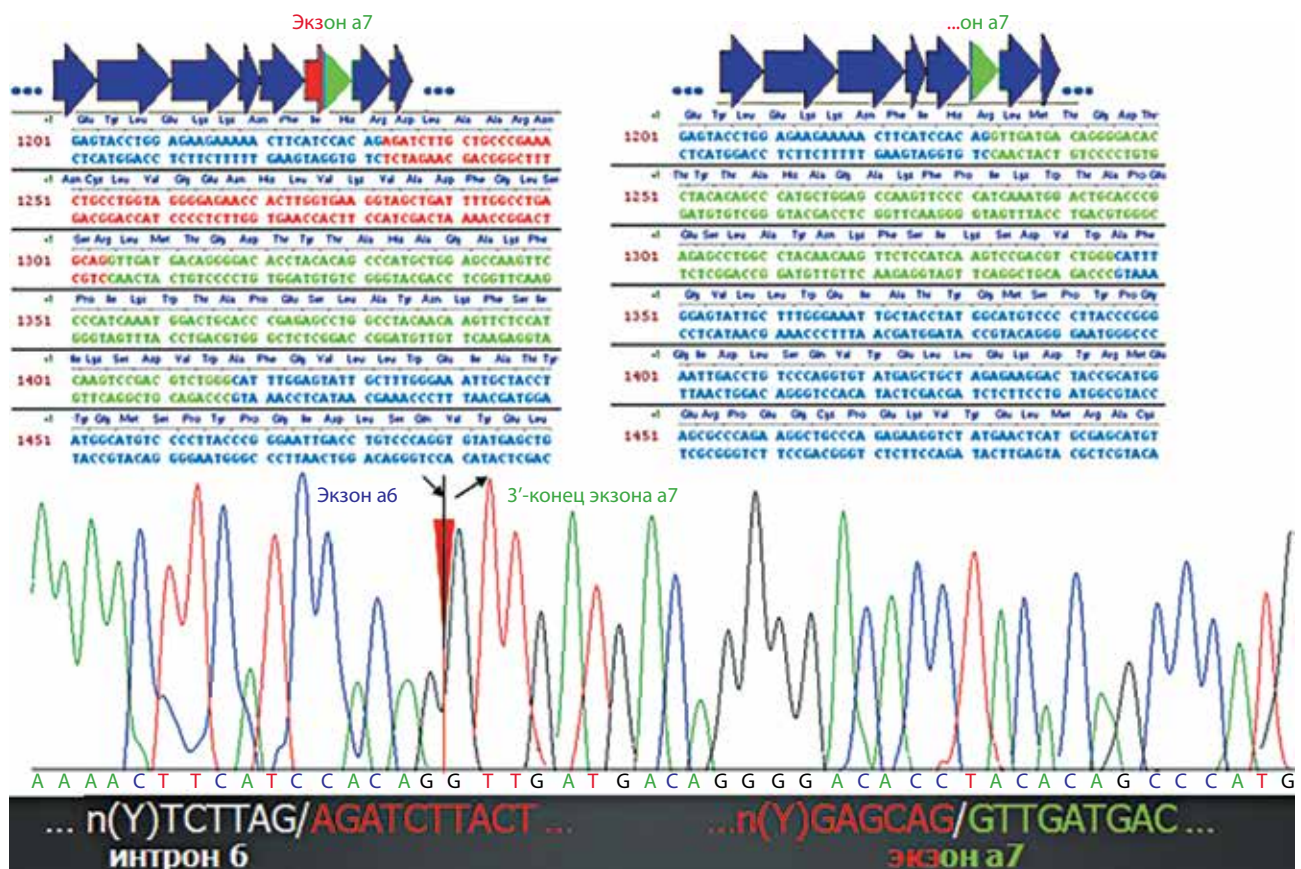


Рис. 6. Делеция 5' – конца экзона a7 гена BCR-ABL у больного хроническим миелолейкозом, резистентного к иматинибу

Таблица 2. Доля мутаций, влияющих на выбор препаратов — ингибиторов тирозинкиназ 2-го поколения для лечения больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу (ингибитору тирозинкиназ 1-го поколения), среди всех обнаруженных мутаций

Мутации	n =	%		Выбор терапии
T315I	35	12,6	12,6 %	ИТК неэффективны (аллоТГСК, клинические исследования)
E255K	16	5,7	25,1 %	Резистентны к нилотинибу
E255V	11	3,9		
F359V	18	6,5		
F359C	7	2,5		
Y253H	18	6,5	8,9 %	Резистентны к дазатинибу
F317L	22	7,9		
F317I	3	1,0		

ИТК — ингибиторы тирозинкиназ, аллоТГСК — аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

обычно не суммируют и не рассматривают в совокупности частоту встречаемости мутаций, перекрестно резистентных к иматинибу и другим препаратам.

Выводы

Исследование подтвердило существенное значение возникновения мутаций в гене *BCR-ABL* для развития резистентности к иматинибу, доля таких больных составила 31 %. Однако у 2/3 больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, такие мутации не выявлены, следовательно, вклад *BCR-ABL*-независимых генетических событий в развитие устойчивости к ИТК-1 является не менее значительным. Результаты данной работы показали, что помимо точечных мутаций причиной

резистентности к препаратам ИТК могут быть другие мутации, которые приводят к более масштабным изменениям структуры белка BCR-ABL. Значительная доля мутаций, приводящих к резистентности к ИТК-2 у больных ХМЛ, получавших терапию ИТК-1, подчеркивает важность мутационного анализа при смене терапии с ИТК-1 на ИТК-2. Некоторое преобладание мутаций, резистентных к нилотинибу, над мутациями, устойчивыми к дазатинибу, можно объяснить структурным сходством молекул иматиниба и нилотиниба, которые в связи с этим имеют пересекающиеся спектры резистентных мутаций. Следует ожидать, что при переходе нилотиниба и дазатиниба в 1-ю линию терапии ХМЛ данная ситуация может измениться.

Благодарность

Благодарим врачей-гематологов за предоставленный клинический материал: М.А. Волкову, В.Л. Иванову, Н.В. Новицкую, Е.Г. Аршанскую, И.Г. Лазареву, Т.И. Пospelову, И.А. Блажиевич, Н.П. Домникову, Т.С. Константинову, Л.Л. Высоцкую, А.К. Голенкова, Е.М. Володичеву, В.А. Лапина, Л.В. Заклякову, Е.Г. Овсянникову, И.Л. Давыдкина, Т.И. Колошейнову, С.Р. Горячеву, А.С. Приступу, Р.А. Голубенко, Л.В. Гаврилову, С.А. Волкову, Г.Б. Кучму, Л.В. Анчукову, Н.А. Вопилину, А.Н. Гавриленко, Г.А. Гайсарову, И.И. Гушанскую, Ю.А. Дунаева, Н.Б. Есеевеву, Н.А. Калинову, К.Д. Капланова, Т.С. Капорскую, Е.Г. Кириллову, Т.А. Киселеву, Т.Ю. Клиторченко, М.В. Косинову, Л.М. Ялунину, О.М. Хомчук, О.М. Фалькович, Г.А. Митрофанову, В.З. Молостову, И.И. Мулину, В.В. Пилюшину, Ж.В. Попову, Т.С. Тикунову, В.С. Скатову, Т.М. Толстокорую, В.А. Тумакову, Т.В. Чагорову, М.М. Чукавину, Р.Г. Штыбель, В.В. Яблокову, Е.А. Самышину, Е.В. Сокурову.

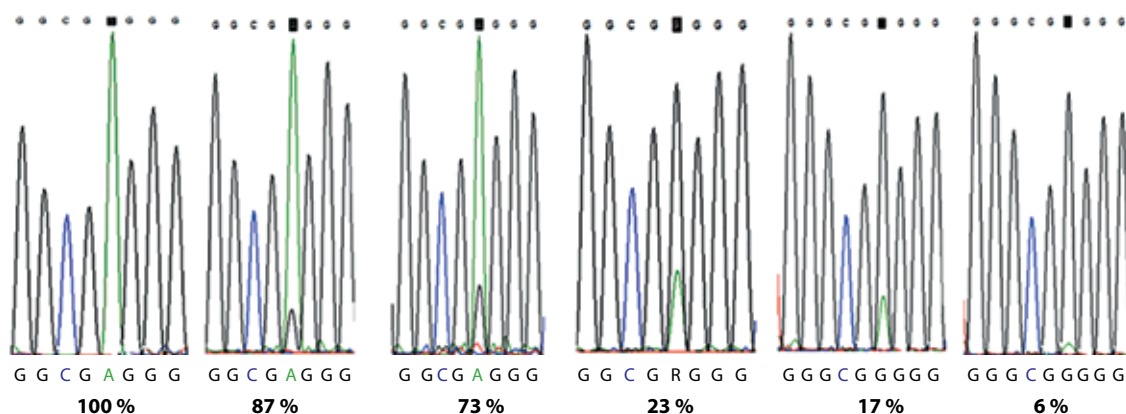


Рис. 7. Эффективное подавление дазатинибом резистентного к иматинибу клона опухолевых клеток, несущего мутацию p. G250E (с. 749G>A). Анализ последующих образцов периферической крови больного хроническим миелолейкозом с интервалом в 2 нед от момента смены терапии

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Ernst T, La Rosée P, Müller M.C., Hochhaus A. BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011 Oct;25 (5):997–1008, v-vi. DOI: 10.1016/j.hoc.2011.09.005. PMID: 22054731.
2. Овсянникова Е.Г., Капланов К.Д., Клиточенко Т.Ю. и др. Мутационный статус резистентных к иматинибу больных хроническим миелолейкозом. *Онкогематология* 2012;4:16–24.
3. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2016 Feb;91(2):252–65. DOI: 10.1002/ajh.24275. PMID: 26799612.
4. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2009 Dec 10;27(35):6041–51. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.0779. Epub 2009 Nov 2. PMID: 19884523.
5. Baccarani M., Pileri S., Steegmann J.-L. et al. on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23 (suppl 7):vii72 – vii77. DOI: 10.1093/annonc/mds228.
6. Jabbour E., Branford S., Saglio G. et al. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011 May 1;117(9):1800–11. DOI: 10.1002/cncr.25717. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21509757.
7. Soverini S., Hochhaus A., Franck E., Nicolini F.E. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia Net. *Blood* 2011;118:1208–15. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326405. PMID: 21562040.
8. Cross N.C. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009 Sep;22(3):355–65. DOI: 10.1016/j.beha.2009.04.001. PMID: 19959086.
9. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Молекулярный мониторинг у пациентов с хроническим миелолейкозом: корреляция с цитогенетическим ответом, прогностическое значение, оценка ответа на терапию. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):151–159.
10. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):160–5.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156–9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999. PMID: 2440339.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ

О.П. Колбацкая, Н.А. Фалалеева, А.М. Моженкова, Н.А. Купрышина, А.И. Павловская

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Александровна Фалалеева falaleeva – n@mail.ru

Введение. Костный мозг (КМ) является одной из «излюбленных» зон поражения при фолликулярной лимфоме (ФЛ) — до 70 % случаев. Вместе с тем сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных ФЛ с иммунофенотипом первичной опухоли и характеристиками неопухолевого микроокружения до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования — сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных ФЛ с иммунофенотипом первичной опухоли и характеристиками неопухолевого микроокружения.

Материалы и методы. В исследование включены 78 больных ФЛ. Во всех случаях диагноз был верифицирован иммуногистохимически в соответствии с критериями классификации Всемирной организации здравоохранения (2008).

Результаты. При отсутствии специфического поражения КМ по данным гистологического исследования у больных отмечено достоверное повышение содержания цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов в КМ — $21,9 \pm 4,5$ и $10,1 \pm 1,7$ %; $p = 0,005$. Наличие специфического поражения по данным гистологического исследования трепанобиоптатов КМ сопровождалось достоверным повышением уровня В-клеток (CD19⁺, CD20⁺), а также CD10⁺ лимфоцитов в аспиратах КМ. Содержание Т-лимфоцитов КМ (CD5⁺CD19⁻) было достоверно более высоким в CD10⁻негативных случаях ФЛ ($32,2 \pm 7,6$ и $13,5 \pm 3,4$ %; $p = 0,021$). Количество В-клеток в КМ (CD19⁺CD5⁻, CD10⁺) было достоверно более высоким в CD10⁻позитивных случаях ($p < 0,05$). В случаях выраженной Т-клеточной инфильтрации первичной опухоли уровни костномозговых В-клеток со специфическим для ФЛ иммунофенотипом (CD10⁺, CD19⁺CD23⁺) были достоверно более низкими, $p = 0,001$ и $0,048$ соответственно. Повышенное содержание лимфоцитов в КМ достоверно ассоциируется с повышенным содержанием Т-клеток: CD3, CD5, CD7, CD4, CD8. Вместе с тем содержание зрелых В-клеток (CD20⁺, CD22⁺) было одинаковым в 2 сравниваемых группах, а содержание В-лимфоцитов (CD19⁺, CD19⁺CD5⁻), а также В-клеток, экспрессирующих HLA-DR, CD23, CD10, CD38, — более высоким при отсутствии лимфоцитоза в КМ. По этим причинам верификация поражения КМ у больных ФЛ должна быть только иммунологической. Уровни зрелых В-лимфоцитов КМ (CD19, CD20, CD22) были достоверно более высокими у больных с нормальным содержанием оксифильных нормобластов в миелограмме.

Заключение. Наши данные указывают на то, что верификация поражения КМ у больных ФЛ должна быть только иммунологической. Т-клеточное микроокружение первичной опухоли препятствует диссеминации ФЛ в КМ. Субпопуляционный состав лимфоцитов КМ взаимосвязан с иммунофенотипом ФЛ (CD10). Костномозговое микроокружение (CD8⁺ лимфоциты) ассоциируется с отсутствием специфического поражения КМ по данным гистологического исследования трепанобиоптатов КМ.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, костный мозг, субпопуляция лимфоцитов

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-110-116

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN FOLLICULAR LYMPHOMA

O.P. Kolbatskaya, N.A. Falaleeva, A.M. Mozhenkova, N.A. Kupryshina, A.I. Pavlovskaya

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia

Introduction. Bone marrow is one of the most common sites of involvement in follicular lymphoma (70 % of cases). Comparison of bone marrow lymphocyte subpopulations with the immunophenotype of primary tumor and its microenvironment has not been done.

Materials and methods. Study has been done in 78 patients with follicular lymphoma. Diagnosis in each case was verified according to criteria of WHO classification (2008).

Objective — to compare subpopulation composition of lymphocytes in bone marrow of patients with follicular lymphoma with immunophenotype of the primary tumor and the characteristics of the non-tumor microenvironment.

Results. Histological detection of bone marrow involvement was associated with significant elevation of mature B-cells (CD19⁺, CD20⁺) as well as CD10⁺ lymphocytes in bone marrow aspiration biopsy specimens. In CD10⁻negative follicular lymphoma T-cell content (CD5⁺CD19⁻) was higher than in CD10⁺ cases (32.2 ± 7.6 % and 13.5 ± 3.4 %; $p = 0.021$). Oppositively, number of B-cells in bone marrow (CD19⁺CD5⁻, CD10⁺) was higher in CD10⁺ cases ($p < 0.05$). Intensive infiltration of primary tumor with T-cells was associated with lower number of bone marrow B-cells with specific follicular lymphoma phenotype — CD10⁺, CD19⁺CD23⁺ — ($p = 0.001$ and 0.048 , correspondingly). Elevation of bone marrow lymphocytes was associated with higher number of mature T-cells in bone

marrow – CD3, CD5, CD7, CD4, CD8. Number of B-cells (CD20+, CD22+) and (CD19+, CD19+CD5-), as well as B-cells expressing HLA-DR, CD23, CD10, CD38 was either equal or even higher in group of patients without lymphocytosis in bone marrow. In the group of normal level of oxyphilic normoblasts in bone marrow higher level of mature bone marrow B-cells (CD19, CD20, CD22) was noted.

Conclusion. Our data confirm that verification of bone marrow involvement in follicular lymphoma should be immunological. T-cell microinvolvement in primary tumor prevents of follicular lymphoma dissemination to bone marrow. Subpopulations of bone marrow lymphocytes are related to the immunophenotype of primary tumor (CD10). Bone marrow microenvironment (CD8+ lymphocytes) correlates with the absence of specific bone marrow involvement according to histology of bone marrow trephine biopsy.

Key words: follicular lymphoma, bone marrow, subpopulation of lymphocytes

Введение

Фолликулярная лимфома (ФЛ) относится к категории периферических мелкоклеточных лимфом. Костный мозг (КМ) является одним из наиболее частых участков метастатического поражения при ФЛ (до 70 % случаев по данным Всемирной организации здравоохранения [1]).

ФЛ возникает из клеток светлых центров фолликулов лимфатических узлов – центробластов и centroцитов. Важную роль в патогенезе заболевания играет транслокация 14;18 с перемещением гена *bcl-2* с хромосомы 18 на хромосому 14 под контроль иммуноглобулиновых генов [2], наблюдаемая в более чем 90 % случаев ФЛ.

Иммунофенотипические характеристики ФЛ хорошо изучены. Это периферическая В-клеточная опухоль, характеризующаяся экспрессией общих В-клеточных маркеров (CD19), маркеров более зрелых этапов В-клеточной дифференцировки (CD20, CD37, мембранные иммуноглобулины). В числе дополнительных маркеров – CD10, CD23, CD38, наличие фолликулярных дендритных клеток CD23+, CD21+.

Иммунофенотип ФЛ достаточно характерен, однако ее диагностика не всегда проста, что может быть связано со слабой экспрессией CD19 в ряде случаев [3], делецией иммуноглобулиновых генов в ходе соматических гипермутаций, характерных для этого типа клеток. Для наиболее полной диагностики ФЛ предложены восьмицветные проточно-цитометрические панели антител Еврофлоу [4].

Важную роль в диагностике и прогнозе ФЛ играет так называемое микроокружение опухолевых клеток. Инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами является признаком благоприятного прогноза, а инфильтрация макрофагами – неблагоприятного [5].

Несмотря на высокую частоту поражения КМ при ФЛ, патогенетические механизмы этого процесса до конца не изучены. Доказана неблагоприятная роль данного фактора в прогнозе ФЛ [6]. В литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи поражения КМ при ФЛ с иммунофенотипом первичной опухоли и опухолевым микроокружением. Практически не разработан вопрос о костномозговом микроокружении опухолевых клеток. **Целью** нашего исследования было сопоставление субпопуляционного состава

лимфоцитов КМ больных ФЛ с иммунофенотипом первичной опухоли и характеристиками неопухолевого микроокружения.

В работе мы оценили субпопуляционный состав лимфоцитов КМ у больных ФЛ, изучили состав лимфоцитов КМ в случаях поражения (на основании гистологического исследования трепанобиоптатов КМ) и без такового. Особое внимание уделили сопоставлению субпопуляционного состава лимфоцитов КМ с иммунофенотипом первичной опухоли. Также проанализированы взаимосвязи с некоторыми показателями гемопоэза у больных – наличием или отсутствием лимфоцитоза в КМ, изменением эритроидной дифференцировки с увеличением процентного содержания оксифильных форм.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все больные проходили обследование и лечение в отделении химиотерапии.

У 78 больных ФЛ проведены анализ субпопуляций костномозговых лимфоцитов и оценка взаимосвязи с поражением КМ по данным гистологического исследования, иммунофенотипом первичной опухоли и характеристиками гемопоэза.

Диагноз ФЛ во всех случаях был верифицирован с помощью иммуногистохимического исследования биопсийного материала первичной опухоли. Морфологическую и иммуногистохимическую диагностику ФЛ, а также гистологическое исследование трепанобиоптатов КМ проводили в отделе патологической анатомии опухолей человека по результатам исследования опухолевой ткани в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (2008) [1].

Исследование показателей гемопоэза, иммунофенотипирование опухоли по криостатным срезам, а также исследование субпопуляций лимфоцитов КМ методом проточной цитометрии проводились в лаборатории иммунологии гемопоэза.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием программы SPSS 16.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

Исследование КМ проведено у 78 больных ФЛ. Общая характеристика иммунофенотипа опухолевых клеток представлена в табл. 1.

Таблица 1. Иммунофенотипическая характеристика лимфоцитов костного мозга в случаях поражения при фолликулярной лимфоме

Маркеры	N	Минимум	Максимум	Среднее	Стандартная ошибка среднего
Т-лимфоциты					
CD3	78	2,30	67,70	22,8756	1,86942
CD7	73	2,20	64,70	22,4603	1,87915
CD5+19 –	58	1,30	62,10	18,8448	2,06258
CD4	69	1,00	50,00	11,7290	1,21106
CD8	68	0,70	51,40	12,8824	1,38382
В-лимфоциты					
CD20	73	0,10	99,70	55,0219	3,16459
CD19	75	1,20	96,70	58,4040	3,03544
CD19+CD23 –	43	0,20	95,10	30,6442	3,55357
CD19+CDD23+	62	0,20	99,80	40,2903	4,19729
CD19+CD5 –	43	1,70	99,40	64,5930	4,06902
CD19+CD5+	65	0,10	92,40	5,9785	1,48672
CD22	14	1,00	98,60	65,8643	9,79761
Мембранные Ig-каппа	22	0,00	90,00	30,5409	7,86474
Мембранные Ig-лямбда	19	0,10	95,60	39,3684	9,63585
Дополнительные маркеры					
HLA-DR	65	9,20	97,60	65,1554	2,82077
CD38	73	0,50	96,90	25,3877	2,92508
CD10	61	0,00	92,40	27,2426	3,67968
CD21	30	0,10	96,90	25,7967	4,99242
CD23	60	0,30	99,80	40,2933	4,30600

Как видно из табл. 1, диапазон Т-лимфоцитов достаточно широк. Уровень В-клеток был низким в случаях отсутствия поражения КМ и высоким при наличии специфического поражения КМ при ФЛ (максимум по CD20+ 99,7 %). В отдельных случаях изучены маркеры и их комбинации, используемые для дифференциальной диагностики мелко-клеточных лимфом: CD79, CD43, CD81, CD200, CD31, CD305, CD11c, CD103, CD95, CD185, CD49d, CD62L, CD39, CD27. Ни в одном из этих случаев не был подтвержден диагноз хронического лимфолейкоза

(В-ХЛЛ), мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфоплазмочитарной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза. Во всех случаях иммунофенотипическая характеристика лимфоидных клеток соответствовала ФЛ.

В табл. 2 сопоставлены уровни различных субпопуляций лимфоцитов у больных с наличием поражения по данным гистологического исследования трепанобиоптатов КМ и при отсутствии такового.

Таблица 2. Количественное сопоставление уровней различных субпопуляций лимфоцитов костного мозга у больных с наличием поражения костного мозга (по данным гистологического исследования) и при отсутствии такового

Маркер, CD	Поражение костного мозга	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего	p
CD3	нет	10	30,3100	5,36637	нд
	есть	32	21,6219	3,09294	
CD7	нет	11	29,8818	5,41952	нд
	есть	28	20,7607	3,03363	
CD5+CD19 –	нет	6	27,4333	6,29050	нд
	есть	19	16,7789	3,88377	
CD4	нет	10	11,1700	2,05091	нд
	есть	29	12,3690	2,13165	
CD8	нет	10	21,8800	4,47933	0,005
	есть	28	10,0643	1,74853	
CD20	нет	8	30,4500	13,07627	0,011
	есть	30	58,0100	4,09746	
CD19	нет	11	36,0273	10,75636	0,013
	есть	27	60,4593	4,12279	
CD19+CD23 –	нет	6	29,6167	13,95993	нд
	есть	16	32,7000	5,09521	
HLA-DR	нет	9	48,8000	11,33653	нд
	есть	24	63,0292	4,24436	
CD38	нет	10	27,5300	7,97329	нд
	есть	30	20,6100	4,00341	
CD10	нет	8	13,1875	4,68331	0,047
	есть	25	29,2240	6,13737	
CD21	нет	3	2,0000	0,50332	0,056
	есть	12	15,4250	6,28543	

Примечание. нд – различия недостоверны.

Как видно из табл. 2, лишь в случаях ФЛ без поражения КМ достоверно повышено содержание

цитотоксических клеток CD8+ в КМ. При наличии поражения по данным гистологического исследования трепанобиоптатов КМ, как и следовало ожидать, был повышен уровень всех В-клеток (CD19+, CD20+), а также CD10-позитивных лимфоцитов.

Мы сравнили субпопуляционный состав лимфоцитов КМ у больных ФЛ в зависимости от первичного иммунофенотипа опухоли. Статистически достоверные данные получены в зависимости от экспрессии антигена CD10 (табл. 3).

Таблица 3. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у больных фолликулярной лимфомой в зависимости от экспрессии CD10 на клетках первичной опухоли

Маркер, CD	CD10	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего	p
CD5+ CD19 –	нет	8	32,2125	7,57926	0,021
	есть	12	13,4667	3,39564	
CD20	нет	10	38,0300	7,91658	0,055
	есть	18	59,0444	6,62203	
CD19+ CD5 –	нет	7	32,8714	9,46094	0,033
	есть	9	63,1444	8,60029	
CD10	нет	5	3,2800	0,73308	0,000
	есть	19	35,2158	7,10091	

Примечание. Сопоставление проведено по всем субпопуляциям, представленным в табл. 2. В табл. 3 представлены только достоверные различия.

Уровень Т-клеток (в данном случае CD5+CD19-лимфоциты) был достоверно более высоким в CD10-негативных случаях ФЛ. Следует отметить, что общее содержание Т-клеток, выявляемых по маркерам CD3 и CD7, также было более высоким в CD10-негативных случаях, однако по этим маркерам различия не были достоверными: для CD3 средние значения $28,4 \pm 5,95$ ($n = 11$) и $20,4 \pm 3,52$ ($n = 22$), для CD7 – $27,2 \pm 6,0$ ($n = 11$) и $18,7 \pm 3,5$ ($n = 19$).

Вместе с тем уровень В-клеток в КМ был более высоким в CD10-позитивных случаях ФЛ, что наиболее отчетливо наблюдается на примере CD19+CD5-субпопуляции. Интересно отметить, что злокачественные клетки КМ сохраняли CD10+ иммунофенотип. Это совсем не очевидно, так как хорошо известно, что при выходе за пределы фолликулярной клетки ФЛ могут утрачивать антиген CD10 [7].

Экспрессия CD23, CD21 на опухолевых клетках, а также наличие CD21+ фолликулярных дендритных клеток в опухолевой ткани не были взаимосвязаны с субпопуляционным составом, а также особенностями иммунофенотипа лимфоидных клеток КМ. Наличие CD23+ фолликулярных дендритных клеток

ассоциировалось с большей пропорцией CD19+CD23+ клеток в КМ: $11,7 \pm 6,1$ % ($n = 5$) и $36,9 \pm 8,96$ % ($n = 16$), $p = 0,033$. Определенная тенденция ($p < 0,05$) отмечена для более высоких уровней В-клеток (CD19+, CD10+, HLA-DR+) в КМ больных CD38-позитивной ФЛ, однако число пациентов с CD38-негативным иммунофенотипом было крайне мало ($n = 3$).

Интересным, с нашей точки зрения, оказалось влияние Т-клеточного микроокружения ФЛ с метастатическим поражением КМ при данном типе опухоли. В случаях выраженной Т-клеточной инфильтрации опухоли уровни В-клеток со специфическим для ФЛ иммунофенотипом (CD10+, CD19+CD23+) были достоверно более низкими, $p = 0,001$ и $0,048$ соответственно.

У большинства больных ФЛ иммунофенотипирование лимфоцитов КМ было проведено на фоне их повышенного содержания. Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов у этой группы больных и больных с нормальным или сниженным количеством лимфоцитов в КМ представлено в табл. 4.

Главный вывод, который можно сделать на основании анализа данных табл. 4, заключается в том, что повышенное содержание лимфоцитов достоверно ассоциируется с повышенным содержанием Т-клеток: CD3, CD5, CD7, CD4, CD8. Вместе с тем содержание зрелых В-клеток, измеряемых на основании мембранной экспрессии антигенов CD20 и CD22, является абсолютно идентичным в 2 сравниваемых группах. Количество В-клеток (CD19+, CD19+CD5-) было более высоким у больных, содержание лимфоцитов в КМ у которых не было повышено. Аналогичные данные получены для всех дополнительных маркеров, используемых при дифференциальной диагностике ФЛ (HLA-DR, CD23, CD10, CD38). Следовательно, повышенное содержание лимфоцитов КМ у больных ФЛ не является указанием на специфическое поражение КМ, так как чаще всего ассоциировано с достоверным увеличением уровня Т-клеток. При этом уровень зрелых В-лимфоцитов в группах с нормальным и сниженным содержанием лимфоцитов также повышен в сравнении с нормой. Напротив, уровни клеток, экспрессирующих маркеры, применяемые в дифференциальной диагностике ФЛ, выше у больных с нормальным или сниженным содержанием лимфоцитов. По этим причинам верификация поражения КМ у больных ФЛ должна быть только иммунологической.

Мы сравнили субпопуляционный состав лимфоцитов КМ с особенностями костномозгового кроветворения у больных ФЛ. Наиболее частым отклонением являлось повышение уровня оксифильных нормобластов, наблюдаемое в анализируемой группе в 69 % случаев. Сравнение субпопуляционного состава

Таблица 4. Сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у больных фолликулярной лимфомой в зависимости от наличия лимфоцитоза в костном мозге

Маркер, CD	Лимфоцитоз	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего	p
CD3	есть	44	21,0477	2,02323	0,009
	нет	8	7,9625	1,43265	
CD7	есть	37	20,2297	2,13617	0,002
	нет	9	9,4444	1,88518	
CD5+CD19-	есть	31	19,6065	2,54463	0,019
	нет	7	6,1429	1,59551	
CD4	есть	38	10,9211	1,29787	0,037
	нет	6	3,7833	0,77003	
CD8	есть	38	10,3421	1,13488	0,032
	нет	6	3,9167	,62419	
CD20	есть	41	61,8146	3,93600	0,830
	нет	9	63,8222	7,48274	
CD19+CD23-	есть	24	34,2792	4,56180	0,220
	нет	2	14,1000	0,10000	
CD19+CD23+	есть	39	42,8231	5,43344	0,04
	нет	7	69,5429	9,94080	
CD19+CD5-	есть	21	72,5857	4,71191	0,010
	нет	5	89,5800	3,63296	
CD19+CD5+	есть	40	5,6825	0,92440	0,180–0,014
	нет	8	2,8000	0,63920	
CD19	есть	38	65,6868	2,61593	0,003
	нет	9	83,6667	4,05822	
Каппа цепь sIg	есть	15	32,8667	9,55514	0,350
	нет	3	56,0333	26,46094	
Лямбда цепь sIg	есть	12	31,0167	12,20308	0,97
	нет	3	32,2000	31,70021	
CD22	есть	7	65,8714	16,89738	0,99
	нет	6	0,65,6667	13,51213	
HLA-DR	есть	33	69,9424	2,92221	0,004
	нет	8	82,6750	2,71496	
CD38	есть	42	20,6452	3,53140	0,040
	нет	8	40,9750	12,50781	
CD10	есть	34	24,7324	4,67723	0,067
	нет	9	45,2444	11,83460	
CD21	есть	22	33,6727	5,96952	0,000
	нет	2	6,6000	0,00000	
CD23	есть	29	46,1138	6,39498	0,000
	нет	4	80,2500	2,56694	

Примечание. Термином «лимфоцитоз» обозначено содержание лимфоцитов выше верхней границы нормы.

Таблица 5. Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов в группах с повышенным и нормальным содержанием оксифильных нормобластов

Маркер CD	Оксифильные нормобласты	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего	p
CD33	норма	27	21,1852	2,81379	нд
	увеличены	21	18,7143	2,48855	
CD7	норма	22	19,2409	2,89134	нд
	увеличены	20	19,2300	2,62765	
CD5+CD19 –	норма	23	17,7435	2,90525	нд
	увеличены	11	20,6364	4,28030	
CD4	норма	21	10,7190	1,86120	нд
	увеличены	19	10,4842	1,70229	
CD8	норма	21	10,0810	1,71442	нд
	увеличены	19	9,8842	1,37158	
CD22	норма	26	67,5462	5,17018	0,054
	увеличены	20	53,8650	4,57792	
CD19+CD23 –	норма	16	32,0062	6,43100	нд
	увеличены	8	32,6625	4,24062	
CD19+CDD23+	норма	24	53,8708	7,10856	нд
	увеличены	18	38,8556	7,15996	
CD19+CD5 –	норма	15	78,7133	5,22328	нд
	увеличены	8	67,3250	8,15727	
CD19+CD5+	норма	26	5,0885	0,92411	нд
	увеличены	18	5,4556	1,66700	
HLA-DR	норма	20	73,2800	4,05049	нд
	увеличены	17	68,3294	3,40149	
CD38	норма	26	21,6500	4,88651	нд
	увеличены	20	26,0800	5,32446	
CD10	норма	24	24,8708	5,71211	нд
	увеличены	15	33,7600	8,01405	
CD21	норма	15	26,8000	6,85084	нд
	увеличены	7	29,5429	9,98818	
CD19	норма	25	72,2200	3,35220	0,03
	увеличены	18	61,1889	3,41027	
CD23	норма	16	50,2125	9,09345	нд
	увеличены	13	53,2077	8,47612	
каппа	норма	9	33,8778	13,03432	нд
	увеличены	8	33,8875	13,36714	
лямбда	норма	9	42,2333	15,70206	нд
	увеличены	5	17,6800	15,76913	
CD22	норма	8	77,0375	11,08836	0,011
	увеличены	2	1,2500	0,25000	

Примечание. нд – различия недостоверны.

лимфоцитов в группах с повышенным и нормальным содержанием оксифильных нормобластов приведено в табл. 5.

Интересно отметить, что только уровень зрелых В-лимфоцитов (CD19, CD20, CD22) был достоверно более высоким у больных с нормальным содержанием оксифильных нормобластов. Это еще раз подтверждает выдвинутое нами ранее на основании гистологического анализа поражения КМ предположение о том, что увеличение количества оксифильных форм не обусловлено выраженностью метастатического поражения КМ, так как наибольшее увеличение количества В-клеток наблюдается при нормальном содержании оксифильных нормобластов в миелограмме.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии достоверных взаимосвязей субпопуляционного состава лимфоцитов у больных ФЛ с наличием гистологически документированного поражения КМ, особенностями иммунофенотипа первичной опухоли и опухолевого микроокружения, а также особенностями гемопоэза у больных ФЛ.

В случаях ФЛ без поражения КМ достоверно повышено содержание цитотоксических клеток CD8+ в КМ. При наличии поражения по данным гистологического исследования трепанобиоптатов КМ был повышен уровень всех В-клеток (CD19+, CD20+), а также CD10-позитивных лимфоцитов.

Уровень Т-клеток (CD5+CD19- лимфоциты) был достоверно более высоким в CD10-негативных

случаях ФЛ. Вместе с тем количество В-клеток в КМ было выше в CD10-позитивных случаях ФЛ, что наиболее отчетливо наблюдается на примере CD19+CD5- субпопуляции. Злокачественные клетки КМ сохраняли CD10+ иммунофенотип.

Т-клеточное микроокружение ФЛ было взаимосвязано с метастатическим поражением КМ: в случаях выраженной Т-клеточной инфильтрации первичной опухоли уровни В-клеток со специфическим для ФЛ иммунофенотипом (CD10+, CD19+CD23+) достоверно более низкие, $p = 0,001$ и $0,048$ соответственно.

Повышенное содержание лимфоцитов в КМ достоверно ассоциируется с повышенным содержанием Т-клеток: CD3, CD5, CD7, CD4, CD8. Вместе с тем содержание зрелых В-клеток (CD20+, CD22+) одинаковое в 2 сравниваемых группах, а содержание В-лимфоцитов (CD19+, CD19+CD5-), а также В-клеток, экспрессирующих HLA-DR, CD23, CD10, CD38, было более высоким при отсутствии лимфоцитоза в КМ. По этим причинам верификация поражения КМ у больных ФЛ должна быть только иммунологической.

Уровни зрелых В-лимфоцитов (CD19, CD20, CD22) были достоверно более высокими у больных с нормальным содержанием оксифильных нормобластов. Следовательно, увеличение количества оксифильных форм не обусловлено выраженностью метастатического поражения КМ, так как наибольшее увеличение количества В-клеток наблюдается при нормальном содержании оксифильных нормобластов в миелограмме.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (Eds.) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press, 2008. P. 439.
2. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J. et al. The t (14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. Science 1985;229(4720):1390–3. PMID: 3929382.
3. Almasri N.M., Duque R.E., Iturraspe J. et al. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1992;40:259–63. PMID: 1380203.
4. van Dongen J.J., Lhermitte L., Botcher S. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leucocytes. Leukemia 2012;26:1908–75. DOI: 10.1038/leu.2012.120. PMID: 22552007. PMCID: PMC3437410.
5. Dave S.S., Wright G., Tan B. et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N Engl J Med 2004;351: 2159–69. DOI: 10.1056/NEJMoa041869. PMID: 15548776.
6. Federico M., Bellei M., Marcheselli L. et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. J Clin Oncology 2009;27:4555–62. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.3991. PMID: 19652063.
7. Dogan A., Du M.Q., Aiello A. et al. Follicular lymphoma contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. Blood 1998;91:4708–14. PMID: 9616169.

СИМПТОМЫ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ: ВЕРОЯТНЫЙ ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Н.А. Фалалеева

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Александровна Фалалеева falaleeva – n@mail.ru

Введение. У 25 % больных фолликулярной лимфомой (ФЛ) на момент установления диагноза присутствуют симптомы интоксикации, или В-симптомы. Вероятно, это обусловлено возникающим при лимфомах дисбалансом эндогенных цитокинов. Усиление продукции некоторых цитокинов сопровождается подъемом температуры тела, нарушением липогенеза, анорексией и, как следствие, снижением массы тела, возникновением ночной профузной потливости, что, возможно, связано с опосредованным влиянием цитокинов на вегетативную нервную систему.

Цель исследования — изучение клинической и прогностической значимости присутствия симптомов интоксикации в дебюте ФЛ.

Материалы и методы. В исследовании анализировалась группа из 74 больных ФЛ, у которых в дебюте заболевания отмечались В-симптомы. Группу сравнения составили 207 больных ФЛ, не имевших на момент установления диагноза симптомов интоксикации, связанных с опухолью.

Результаты. У больных с В-симптомами имела место достоверно более высокая оценка по шкале ECOG, достоверно чаще наблюдалось снижение уровня гемоглобина < 120 г/л, достоверно чаще отмечались повышение уровня лактатдегидрогеназы и снижение общего белка в сыворотке крови. Наличие В-симптомов при ФЛ указывает на высокую опухолевую нагрузку. У большинства таких больных установлены распространенные стадии ФЛ (90,5 %), достоверно чаще встречалось поражение более чем 4 зон лимфатических узлов (75,7 %), как проявление генерализованного нодального опухолевого процесса достоверно чаще отмечалось поражение периферических лимфатических узлов, расположенных выше диафрагмы (81,1 %), лимфатических узлов средостения (35,1 %), забрюшинного пространства (74,3 %). На момент диагностики ФЛ у значительного числа больных выявлялось поражение более 1 экстранодального органа, достоверно чаще диагностировалось поражение селезенки и печени. В соответствии с критериями FLIPI 64,2 % больных ФЛ, имеющих В-симптомы, были отнесены к группе высокого риска. У больных с В-симптомами качество ответа на терапию первой линии было достоверно хуже: у 25 % отмечена прогрессия опухоли во время лечения или сразу после его окончания. Наличие В-симптомов достоверно ухудшает показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования.

Заключение. Наличие симптомов интоксикации является самостоятельным неблагоприятным прогностическим фактором и должно учитываться при выборе тактики ведения больных ФЛ.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, симптом интоксикации

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-117-122

INTOXICATION SYMPTOMS IN FOLLICULAR LYMPHOMA: PROBABLE PATHOGENESIS AND CLINICAL SIGNIFICANCE

N.A. Falaleeva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. About 25 % of patients at diagnosis of follicular lymphoma have intoxication symptoms, which are probably induced by endogenous cytokines. Production of several cytokines may be followed by temperature, lipogenesis disturbances, anorexia, body weight loss and so on. The pathogenesis of intoxication symptoms and its clinical significance are not completely understood in follicular lymphoma.

Objective — to investigate the clinical and prognostic significance of presence of intoxication symptoms at the opening stages of follicular lymphomas.

Materials and methods. We've characterized a group of 74 follicular lymphoma patients, which had at time of diagnosis B-symptoms. Comparison group included 207 patients without intoxication symptoms.

Results. In patients with B-symptoms we noted higher estimation according to ECOG scale, more frequent of haemoglobin diminution less than 120 g/l. It was more frequently noted elevation of LDH levels and diminution of serum total protein concentration. Presense of intoxication symptoms usually indicated the more tumor burden in patients: in 90,5 % advanced disease stages, in 75,7 % involvement of more than 4 nodal zones, in 81,1 % peripheral lymph nodes above diaphragm were involved, in 35,1 % mediastinal lymph nodes,

and in 74,3 % of patients retroperitoneal lymph nodes were involved. More frequently in patients with intoxication symptoms more than one extranodal zone was involved, especially spleen and hepar. According to FLIPI 64,2 % of follicular lymphoma patients with B-symptoms were of high risk group, and they had worse quality of treatment response: in 25 % of cases progression during or soon after treatment was noted. Intoxication symptoms negatively influenced on overall survival, but not on the duration of treatment response.

Conclusion. Intoxication symptoms significantly affects overall survival and survival without progression in follicular lymphoma patients.

Key words: follicular lymphoma, intoxication symptom

Введение

Фолликулярная лимфома (ФЛ) — периферическая В-клеточная лимфома, возникающая из клеток светлых центров фолликулов и характеризующаяся патологической пролиферацией и накоплением этих клеток [1]. Выгодно взаимодействуя с нормальными неопухолевыми клетками — фолликулярными дендритическими клетками, фибробластами, макрофагами, Т-лимфоцитами, а также клетками стромы и микроокружения, лимфомные клетки приобретают преимущества для выживания, роста и метастазирования [2, 3].

Приблизительно в 25 % случаев у больных ФЛ наблюдаются так называемые симптомы интоксикации, или общие симптомы, или В-симптомы: лихорадка без видимого инфекционного процесса, значимое снижение массы тела, профузная ночная потливость [4]. Присутствие В-симптомов клинически расценивается как высокая биологическая активность опухоли и ассоциируется с плохим прогнозом, высокой частотой трансформации ФЛ в диффузную В-крупноклеточную лимфому, указывает на высокую опухолевую нагрузку в соответствии с критериями GELF [4, 5].

Причины возникновения В-симптомов неизвестны. Однако получено достаточное количество свидетельств в пользу того, что их возникновение при лимфомах обусловлено нарушением продукции эндогенных цитокинов как самими опухолевыми клетками, так и клетками микроокружения [1, 2, 6]. С одной стороны, цитокины играют важнейшую роль в патогенезе самой лимфомы, являясь механизмом взаимодействия опухоли с микроокружением, с другой стороны, возникающий цитокиновый дисбаланс ведет к патологической выработке определенных цитокинов и к адекватному ответу на них нетрансформированных клеток, т. е. к реализации системной реакции организма [1, 6]. Усиление продукции некоторых цитокинов и интерлейкинов, накопление их в крови (γ -интерферона, фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерлейкина 1β и интерлейкина 6 (ИЛ-6)) сопровождается подъемом температуры тела, а длительное воздействие этих медиаторов ведет к нарушению липогенеза, анорексии и, как следствие, к снижению массы тела и кахексии. Возникновение ночной профузной потливости, по всей вероятности, связано с опосредованным влиянием цитокинов на вегетативную нервную систему [6–10]. Отмечена

достоверная положительная корреляция между повышением уровня ИЛ-6 и ФНО- α и присутствием В-симптомов у больных ФЛ [1, 2, 6].

Следует отметить, что системное действие цитокинов не ограничивается развитием В-симптомов. Так, по данным разных авторов, при повышении уровня цитокинов, в частности ИЛ-6 и ФНО- α , у больных достоверно чаще отмечается снижение уровня гемоглобина, вероятно, как следствие подавления процесса дифференцировки клеток эритроидного ряда и негативного влияния на выработку эритропоэтина [1, 6, 11], а также сокращения времени жизни эритроцита до 60–90 дней [12]. Уровни цитокинов прямо коррелируют с объемом опухоли, стадией заболевания, уровнем лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и альбумина [1, 2, 6].

С недавнего времени установлено, что действие большинства цитокинов подавляется глюкокортикоидами. Клиницистам известно, что назначение их больному лимфомой, страдающему В-симптомами, позволяет быстро справиться с последними и облегчить общее состояние, и это также косвенно свидетельствует о причастности цитокинов к возникновению В-симптомов. Стойкое исчезновение В-симптомов после проведения противоопухолевого лечения характеризует его эффективность и коррелирует со снижением уровня ИЛ-6 и ФНО- α . **Цель исследования** — изучение клинической и прогностической значимости присутствия симптомов интоксикации в дебюте ФЛ.

В настоящем исследовании у 74 (26,3 %) из 281 больного ФЛ в дебюте заболевания наблюдались симптомы интоксикации: фебрильная лихорадка, значимое снижение массы тела, профузная ночная потливость. Нами проанализированы клинические характеристики этой группы больных, а также непосредственные и отдаленные результаты лечения.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») Минздрава России. Все включенные в исследование больные ФЛ ($n = 281$) наблюдались, проходили обследование и лечение в отделении химиотерапии гемобластозов.

Проведен сравнительный анализ частоты некоторых клинических и лабораторных характеристик,

а также результатов лечения и сроков жизни больных ФЛ в 2 группах: 1-ю группу составили 74 пациента, у которых заболевание сопровождалось симптомами интоксикации; во 2-ю группу включены 207 больных, у которых в дебюте заболевания В-симптомы отсутствовали.

Морфологическая диагностика ФЛ проводилась в отделе патологической анатомии опухолей человека по результатам гистологического исследования опухолевой ткани. Для установления иммуноморфологического варианта лимфомы применяли иммуногистохимическое (иммуоферментное) окрашивание биоптата опухоли по парафиновым блокам и/или иммунофенотипирование клеток экстрамедуллярной опухоли методом иммунофлуоресцентного окрашивания свежемороженных (криостатных) срезов в лаборатории иммунологии гемопоеза. Во всех случаях диагноз ФЛ устанавливали в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения 2008 г. [13].

Всем больным проведено общеклиническое обследование с применением современных общепринятых методов диагностики онкогематологических заболеваний. В том числе были изучены показатели крови с использованием норм, принятых в РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Для установления степени распространения опухолевого процесса использовали классификацию, принятую в Энн-Арбор (1971).

Анализ непосредственных результатов терапии проведен с учетом международных стандартизованных критериев ответа на лечение при неходжкинских лимфомах [14].

Статистический анализ общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования выполнен по методике Каплана–Майера (1956). Непараметрические данные сравнивали с помощью таблиц сопряженности признаков по критерию χ^2 Пирсона (1990). Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы SPSS 22.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

Нами проведен сравнительный анализ частоты некоторых клинических и лабораторных характеристик, а также результатов лечения и сроков жизни больных с симптомами интоксикации (лихорадка без видимого инфекционного процесса, значимое снижение массы тела, профузная ночная потливость) и без таких симптомов.

У всех включенных в исследование пациентов ($n = 281$) диагноз ФЛ был установлен впервые, из них 225 находились под наблюдением от 4 до 216 мес, среднее значение — 64 мес, медиана времени наблюдения

не достигнута. Первую группу составили 74 (26,3 %) пациента, у которых в дебюте ФЛ отмечались В-симптомы. Во 2-ю группу (сравнения) вошли 207 (73,7 %) больных, у которых В-симптомы отсутствовали.

Возраст больных 1-й группы варьировал от 23 до 85 лет при среднем значении 57,9 года; во 2-й группе средний возраст составил 54,5 года, с разбросом от 23 до 84 лет. Число пациентов старше 60 лет достоверно не различалось ($p = 0,148$). Соотношение мужчин и женщин также было сопоставимым, с некоторым преобладанием женщин в обеих группах ($p = 0,566$).

Клинические параметры больных в 2 группах на момент установления диагноза представлены в таблице.

При анализе иммуногистохимических характеристик экстрамедуллярной опухолевой ткани получены следующие результаты. В обеих группах I, II и III цитологические типы ФЛ присутствовали в сопоставимых пропорциях: I цитологический тип — 39,1 и 30,5 %, II — 44,9 и 57,0 %, III — 16,0 и 12,5 %, различия статистически недостоверны ($p = 0,273$). Не выявлены различия при анализе уровня пролиферативной активности опухоли — Ki67. Количество случаев с высоким (> 30 %) уровнем этого маркера достоверно не различалось ($p = 0,998$).

Анализ иммунологических параметров опухолевых клеток показал, что частота экспрессии CD10 была выше во 2-й группе больных (без В-симптомов) — 76,4 % против 62,3 %, $p = 0,035$. Экспрессия активационного антигена CD23 на опухолевых клетках также чаще определялась во 2-й группе — 39,6 % против 23,6 %, $p = 0,035$. Антиген CD21 экспрессировался в сопоставимых процентах случаев — 28 и 25 % ($p = 0,785$).

В соответствии с критериями FLIPI 3 и более факторов неблагоприятного прогноза определены у 52 (64,2 %) больных в 1-й группе и 51 (24,6 %) во 2-й группе. Обратное соотношение обнаружено в группе благоприятного прогноза по FLIPI — наличие 0–1 фактора наблюдали с частотой 9,9 и 44,0 % соответственно. Различие статистически достоверно ($p = 0,000$).

Распределение больных по стадиям заболевания в 2 группах также достоверно различалось. У подавляющего большинства больных, имеющих симптомы интоксикации на момент установления диагноза (1-я группа), диагностировались распространенные — III и IV стадии заболевания: 90,5 % против 63,8 % во 2-й группе ($p = 0,000$).

При анализе общего состояния пациентов на момент определения тактики лечения по шкале ECOG 67,6 % больных 1-й группы имели значительные соматические нарушения, во 2-й группе больные с неудовлетворительным общим статусом составили 19,3 %. Различие высокодостоверно ($p = 0,000$).

Сопоставление клинических характеристик больных фолликулярной лимфомой с симптомами интоксикации и без таковых

Признак	1-я группа: В-симптомы+ (n = 74)		2-я группа: В-симптомы – (n = 207)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Возраст > 60 лет	32	43,2	70	33,8	0,148
Пол: мужской женский	22 52	29,7 70,3	70 137	33,8 66,2	0,566
Цитологический тип фолликулярной лимфомы: I II III	27 31 11	39,1 44,9 16	60 113 24	30,5 57 12,5	0,273
Ki67 ≥ 30 %	15	39,9	47	39,9	0,998
Прогноз по FLIPi: хороший промежуточный плохой	8 21 52	9,9 25,9 64,2	91 65 51	44 31,4 24,6	0,000
Стадия: I–II III–IV	7 67	9,5 90,5	75 132	36,2 63,8	0,000
Оценка по шкале ECOG: 0–1 2–4	24 50	32,4 67,6	167 40	80,7 19,3	0,000
Повышение уровня лактатдегидрогеназы	32	43,2	41	19,8	0,000
Гемоглобин < 20 г/л	33	45,8	35	16,9	0,000
Снижение уровня общего белка < 66 г/л	19	26,8	15	7,5	0,000
Поражение костного мозга	41	55,4	62	30	0,000
Число зон нодального поражения ≥ 4	56	75,7	91	44	0,000
Опухолевые образования размером > 6,0 см	40	54,1	87	42	0,074
Количество зон экстранодального поражения > 1	40	50,1	43	20,8	0,000
Поражение селезенки	37	50	32	15,5	0,000
Поражение печени	15	20,3	10	4,8	0,000

Нами проанализирован ряд лабораторных параметров у больных обеих групп. Уровень ЛДГ был повышенным в дебюте заболевания у 43,2 % пациентов 1-й группы, во 2-й группе доля больных с уровнем ЛДГ > 450 Ел/л оказалась меньше – 19,8 %, различие высокодостоверно ($p = 0,000$). При анализе прочих биохимических показателей отмечено достоверно более частое снижение уровня общего белка в группе больных с неблагоприятным прогнозом – 25,8 % против 7,5 %. Различия статистически достоверно ($p = 0,000$).

При анализе гемограмм выявлено достоверно более частое снижение уровня гемоглобина, < 120 г/л, у больных 1-й группы ($p = 0,000$). Мы сопоставили прочие показатели гемограмм больных. Частота повышения уровня лимфоцитов крови в 1-й группе составила 14,8 %, во 2-й – только 5,2 %, снижение

абсолютного числа лимфоцитов чаще выявлялось в группе больных с В-симптомами – 23 % против 17,3 %, различие достоверно ($p = 0,02$). Примечательно, что изучение состава миелограмм обнаружило сопоставимую частоту повышения уровня лимфоцитов костного мозга в 2 группах – 48,6 и 45,2 % ($p = 0,696$). При этом поражение костного мозга по данным морфологического исследования трепанобиоптатов подвздошных костей устанавливалось достоверно чаще в 1-й группе – 55,4 % ($n = 41$) против 30 % ($n = 62$) во 2-й группе, $p = 0,000$.

Процент больных, у которых при обследовании в дебюте лимфомы обнаружено опухолевое поражение лимфатических узлов (ЛУ) в 4 и более зонах, был достоверно выше в 1-й группе – 75,7 % против 44 %, $p = 0,000$. Также проанализирована частота встречаемости различных локализаций поражений ЛУ

(периферические, средостенные, внутрибрюшинные, забрюшинные). У больных, имевших в дебюте заболевания В-симптомы, достоверно чаще в лимфотический процесс вовлекались периферические ЛУ, расположенные выше диафрагмы, — 81,1 % против 67,1 % ($p = 0,024$), ЛУ средостения — 35,1 % против 14 % ($p = 0,000$), ЛУ забрюшинного пространства — 74,3 % против 51,2 % ($p = 0,02$). Опухолевые образования более 6 см одинаково часто наблюдались в обеих группах — 51,4 и 42,0 % ($p = 0,074$).

Был проанализирован другой параметр, отражающий распространенность опухолевого процесса, — поражение 2 и более экстранодальных органов. Такие клинические ситуации наблюдались достоверно чаще в 1-й группе — 50,1 % против 20,8 % во 2-й группе. Различия высокодостоверно ($p = 0,000$). Среди экстранодальных органов в 1-й группе достоверно чаще встречалось поражение селезенки — 50 % против 15,5 % ($p = 0,000$) и печени — 20,3 % против 4,8 %. Различия высокодостоверно ($p = 0,000$). Различия в частоте поражения других экстранодальных органов не отмечены.

Мы изучили непосредственные результаты терапии первой линии ФЛ у 64 больных 1-й группы и у 171 больного 2-й группы. Терапевтические подходы и методы лечения, предложенные больным обеих групп, оказались сопоставимы. Первое лечение оказалось успешным, достигнута полная или частичная ремиссия у 41 (64,1 %) пациента 1-й группы и 130 (76 %) больных 2-й группы. Прогрессирование опухоли во время лечения или сразу после его окончания достоверно чаще наблюдалось у больных 1-й группы — 25 % против 9,9 %, $p = 0,032$.

В завершение мы проанализировали отдаленные результаты лечения у 225 больных ФЛ, включенных в исследование. При изучении кривых общей выживаемости выявлено достоверно неблагоприятное влияние присутствия у больного ФЛ симптомов интоксикации, связанных с опухолью, на результаты лечения; медиана сроков жизни больных 1-й группы — 93 мес, во 2-й группе — не достигнута, $p = 0,000$ (рис. 1). Фактор достоверно влияет и на показатели выживаемости без прогрессирования, медианы 20 и 54 мес соответственно, $p = 0,007$

Заключение

Известно, что у чуть менее трети больных ФЛ на момент установления диагноза отмечается присутствие симптомов интоксикации [4]. В последние 20 лет обсуждается вероятная патогенетическая связь возникновения В-симптомов при лимфомах с нарушением продукции эндогенных цитокинов как самими опухолевыми клетками, так и клетками микроокружения. В ряде работ выявлена достоверная положительная корреляция между повышением уровня некоторых из них — цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α ,

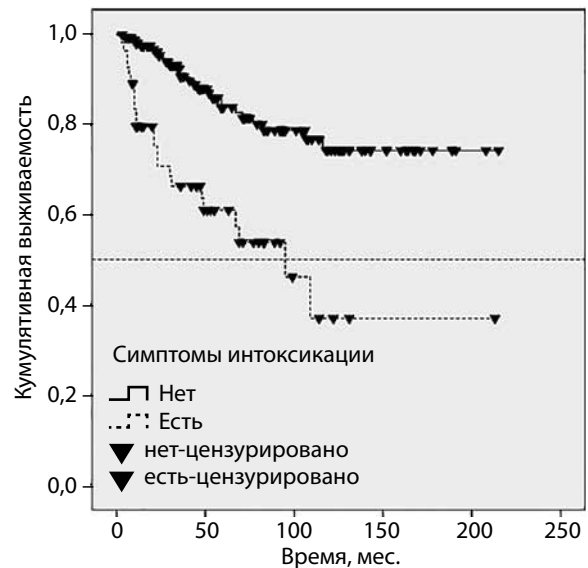


Рис. 1. Общая выживаемость больных фолликулярной лимфомой в зависимости от наличия симптомов интоксикации

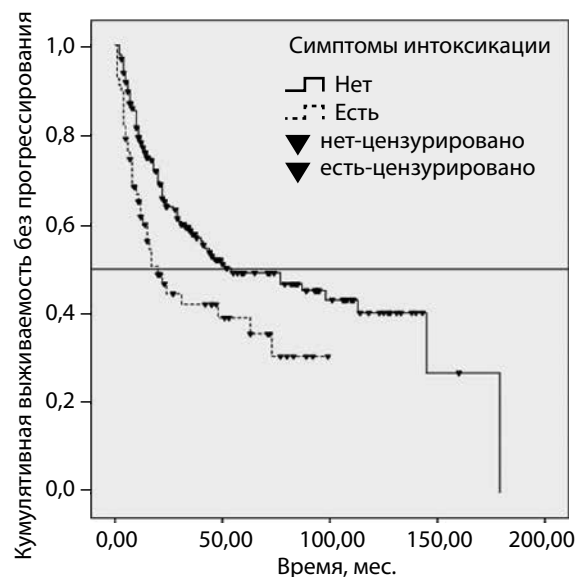


Рис. 2. Выживаемость без прогрессирования больных фолликулярной лимфомой в зависимости от наличия симптомов интоксикации

непосредственно участвующих в патогенезе самой лимфомы, — и наличием В-симптомов [1, 2, 6].

Анализировалась группа больных ФЛ, у которых в дебюте заболевания отмечались В-симптомы: лихорадка без видимого инфекционного процесса, значимое снижение массы тела, профузная ночная потливость. Для определения клинических и биологических особенностей ФЛ проводилось сравнение клинических и лабораторных характеристик, определенных на момент постановки диагноза ФЛ, а также непосредственных и отдаленных результатов лечения у пациентов с В-симптомами и больных без симптомов интоксикации, связанных с опухолью.

Было установлено, что больные с В-симптомами имели достоверно более высокую оценку по шкале ECOG. Их неудовлетворительное общее состояние могло быть обусловлено в том числе и усилением продукции некоторых цитокинов, таких как ИЛ-6 и ФНО- α , одним из эффектов которых является развитие астенического синдрома [8, 10].

В группе больных с В-симптомами достоверно чаще наблюдалось снижение уровня гемоглобина < 120 г/л. Одним из механизмов развития анемии, помимо синдрома гиперспленизма и массивного поражения костного мозга, может быть влияние цитокинов [1, 6, 11, 12]. Достоверно чаще отмечались повышение уровня ЛДГ и снижение уровня общего белка – параметров, положительно и отрицательно коррелирующих с уровнем цитокинов [1].

Нами полностью подтвержден тот факт, что наличие В-симптомов при ФЛ указывает на высокую опухолевую нагрузку. У большинства больных установлены распространенные стадии ФЛ (90,5 %), достоверно чаще встречалось поражение более чем 4 зон ЛУ (75,7 %). Как проявление генерализованного

нодального опухолевого процесса достоверно чаще отмечалось поражение периферических ЛУ, расположенных выше диафрагмы (81,1 %), ЛУ средостения (35,1 %), забрюшинного пространства (74,3 %). На момент диагностики ФЛ у значительного числа больных выявлялось поражение более 1 экстранодального органа, достоверно чаще диагностировалось поражение селезенки и печени.

В соответствии с критериями FLIPI 64,2 % больных ФЛ, имеющих В-симптомы, были отнесены к группе высокого риска. Наличие В-симптомов является самостоятельным неблагоприятным прогностическим фактором, качество ответа на терапию первой линии у этих больных было достоверно хуже. У 25 % больных отмечено прогрессирование опухоли во время лечения или сразу после его окончания. Следует отметить, что симптомы интоксикации либо сохранялись, либо исчезали на короткое время, как правило, на время проведения противоопухолевого лечения. Наличие В-симптомов достоверно ухудшает показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Khalifa K., Alkilani A., Hisman I. et al. Evaluation of Biochemical Markers as Prognostic Factors in Malignant Lymphoma. J of Egyptian Nat Cancer Inst 2008;20(1):47–54. PMID: 19847281.
2. Attia F., Hassan A., Maraghy E. et al. The clinical significance of suppressor of cytokine signaling-3 mRNA expression in patients with non-Hodgkin's lymphoma with chemotherapy. Cancer Biomark 2011–2012;11(1):41–7. DOI: 10.3233/CBM-2012-0262. PMID: 22820139.
3. Ame-Thomas P., Maby-El Hajjami H., Monvoisin C. et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. Blood 2007;109(2):693–702. DOI: 10.1182/blood-2006-05-020800. PMID: 16985173.
4. Wagner-Jonston N.D., Link B.K., Byrtek M. et al. Outcomes of transformer follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). Blood 2015; 126(7):851–57. DOI: 10.1182/blood-2015-01-621375. PMID: 26105149. PMCID: PMC4543911.
5. Ardeshtna K.M., Smith P., Norton A. et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomized controlled trial. Lancet 2003;362(9386):516–22. PMID: 12932382.
6. Kurzrock R., Reman J., Cabanillas F. et al. Serum Interleukin 6 levels Are Elevated in Lymphoma Patients and Correlate with Survival in advanced Hodgkin's Disease and B symptoms. Cancer Res 1993;53(9):2118–22. PMID: 8481913.
7. Quesada J., Talpaz M., Rios A. et al. Clinical toxicity of interferons in cancer patients: a review. J Clin Oncol 1986;4:234–43. PMID: 2418169.
8. Feinberg B., Kurzrock R., Talpaz M. et al. A Phase 1 trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients. J Clin Oncol 1988;6:1328–34. PMID: 3411344.
9. Tewari A., Buhles W., Starnes H. Preliminary report: effect of interleukin-1 on platelet counts. Lancet 1990;336:712–4. PMID: 1975894.
10. Opp M., Obal F., Cady A. et al. Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic. Physiol. & Behav 1989;45:1069–72. PMID: 2476835.
11. Means R.T. Jr. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. Stem Cells 1995;13:32–7. DOI: 10.1002/stem. 5530130105. PMID: 7719246.
12. Salvarini C., Casali B., Salvo D. et al. The role of interleukine-1, erythropoietin and red cell bound immunoglobulins in the anemia of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 1991;9:241–6. PMID: 1879083.
13. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (Eds.) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press, 2008.
14. Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B. et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol 1999;17:1244. PMID: 10561185.